

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR Y TERAPIA
ANTISENTIDO EN ACIDURIA
METILMALÓNICA AISLADA.**

ANA RINCÓN VELA
TESIS DOCTORAL
Madrid, 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR Y TERAPIA
ANTISENTIDO EN ACIDURIA
METILMALÓNICA AISLADA.**

Directora de tesis: Belén Pérez

Memoria presentada por la Licenciada Ana Rincón Vela para optar al grado
de Doctor en Bioquímica

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la Prof. Magdalena Ugarte, Catedrática del Departamento de Biología Molecular en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” de la Universidad Autónoma de Madrid, con la ayuda de una beca concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación (2005-2009)

AGRADECIMIENTOS

La verdad es que siempre imaginé que este día estaba aún muy lejos y sin embargo, aquí estoy, escribiendo los agradecimientos de mi tesis.

Me gustaría agradecer a la doctora Magdalena Ugarte por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y conocer así, de primera mano, lo que significa ser una gran investigadora. Sin esa confianza depositada en mí esto no habría sido posible.

A mi directora de tesis, Belén, por enseñarme a trabajar aquí, por confiar en mí para este trabajo y por insistir en que hable en los congresos aún sabiendo lo poco que me gusta. Gracias por todo.

A Lourdes, por ser ese punto complementario de Belén, por ser una luchadora y enseñarme la primera vez que fui a prácticas. A Pilar por su amabilidad y por poner ese empeño en todo lo que hace.

A mis técnicas favoritas, Rosa, Ascen y Fátima, por soportar que las persiguiera en mis primeros años, por estar siempre ahí para cualquier cosa, por toda la ayuda prestada, por cada café y cada comida. Por ser ellas mismas.

A Carmen, por ser incombustible y por enseñarme a trabajar en cultivos como nadie.

A todas las BECARIAS, con mayúsculas. Patricia, Ana I. (ya no tan becaria), Rocío, Sandra y Ana J. Por aguantarme, por ser como son. Gracias por todas esas charlas a la hora del café, por la ayuda prestada cuando las cosas van mal. Porque este laboratorio no sería lo mismo sin ellas, les deseo desde aquí muchísima suerte. A Cris, que ya siguió adelante, muchísimas gracias por haber sido mi compañera en estos años, por tu sinceridad, por tus discusiones locas, por haber formado esa pareja tan especial conmigo.

A Eva y Alex, por ser como son, por su paciencia cuando no había espacio para todos.

A la gente que se quedó en el C-X, por esos primeros años de trabajo entre un grupo tan genial. A Bego y a Celia, por ser una pareja increíble, a toda la gente que trabaja día a día en diagnóstico, en especial a Isaac, por todas las charlas “frikis” que hemos tenido y por su ayuda en la etapa final, no cambies nunca. A las bio-secrees que han estado allí desde el principio (Juli, Eva e Isa), gracias por vuestra ayuda con todos los papeleos y por resignaros cuando colapsábamos la impresora con las “montañitas”. A los que estuvieron pero ya no están, en especial a Iria, Julio y Yoli, por los buenos momentos compartidos.

A Álvaro, por ayudarme tanto, por aguantarme en mis malos momentos, por haber sido parte de todos los buenos, por significar un gran apoyo para mí.

A mi familia, sin la que hoy no sería una persona, por su confianza en mí, por estar siempre a mi lado y ayudarme y apoyarme en todo lo que me he propuesto desde siempre. Porque al final, son lo único que queda. Me hubiera gustado que los que no

están pudieran disfrutar de este día y espero que, estén donde estén, se sientan orgullosos de mí.

A mis padres.

SUMMARY

Isolated methylmalonic aciduria (MMAuria), combined with homocystinuria (MMAHC) and isolated homocystinuria (HC) are a group of heterogeneous human diseases, caused by at least 8 different genes involved in the intracellular metabolism of cobalamin. The main aim of this work has been the molecular characterization of 21 patients with isolated methylmalonic acidemia and one patient with homocystinuria and the functional analysis of the identified allelic variants with the purpose of investigating new therapeutic strategies. Based on the genetic analysis we have classified our patients in 10 *cblA*, 6 *cblB*, 5 *mut* and one *cblE* affected patients. The mutational spectrum of the MMAA gene includes 8 different allelic variants; all of them, except one (p.R188G) are mutations that produce a premature stop codon (PTC). There are 3 small duplications (c.456delT, c.812-813dupAG and c.592-595del4) and 4 nonsense mutations (c.64C>T, c.358C>T, c.397C>T and c.433C>T). Despite having the most severe mutations in both alleles, the patients belonging to the *cblA* complementation group had a milder biochemical phenotype than *cblB* or *mut* affected patients with a positive in vivo response to vitamin B₁₂. Using real time PCR analysis and aspecific probe we have analysed the mRNA levels in *cblA* cell lines and the results suggest that the mRNA bearing PTC mutations avoid the nonsense-mediated decay system. The high number of *nonsense* mutations and the avoidance of the NMD system make feasible the treatment of *cblA* affected patients with read-through compounds, such as PTC124 (Ataluren) and represent the scientific basis of this clinical assay in Europe. Regarding mutational spectrum of patients belonging to the *cblB* complementation group, we have identified 7 different mutations, 3 of them *missense* mutations and the other 4 affecting normal *splicing* (c.584G>A, c.291-1G>A, c.290G>A and c.349-1G>C). Concerning the propionate uptake, two different patterns of *in vitro* response to cobalamin were observed, three patients were refractory and three patients with *in vitro* response to B₁₂. The genetic studies and their relationship with the biochemical phenotype suggest the identification of four novel severe mutations (c.556C>T, c.291-1G>A, c.290G>A y c.349-1G>C) that are probably associated with a lack of in vitro B₁₂ response, while we have identified 2 *missense* mutations associated with in vitro response (p.I96T and p.R191W). These mutations are probably structural ones with some residual activity, and the patients are candidates to be treated with pharmacological chaperones. The genetic analysis of the patient with isolated homocystinuria revealed one *missense* mutation previously described (p.V57M) with a discordant familiar inheritance which can be explained by the existence of a big deletion or a uniparental disomy that has to be studied. Regarding the patients belonging to the *mut* complementation group, direct sequencing of the products obtained by RT-PCR and subsequent analysis of genomic DNA revealed three nucleotidic variants (c.1935-891C>A, c.1935-898A>G and c.1934-920C>A). These variants will activate cryptic splice sites located in the middle of intron 11 and may be disease causing mutations by the insertion of a 76bp sequence resembling a pseudoexon. Finally, we have developed a pseudoexon-exclusion therapy using antisense morpholino oligonucleotides (AMO) targeted to the 5' splice site. Using different concentrations of AMO we have rescued MCM activity in a therapeutic level in the affected patients bearing c.1957-891C>A and c.1957-898A>G but we have not restored MCM activity in patients bearing the c.1957-920C>A mutation. These results together with the splicing analysis using minigenes may indicate that the mutations c.1957-891C>A and c.1957-898A>G are disease causing mutations and we cannot therefore conclude at present whether the allelic variant c.1957-920C>A is or not

pathogenic itself. Our results suggest that the antisense strategy could be clinically promising to treat human genetic diseases with this type of mutations.

ABREVIATURAS

AdoCbl:	Adenosilcobalamina
ADP:	Adenosina difosfato
AMO:	Oligonucleótido antisentido tipo morfolino (<i>Antisense Morpholino Oligonucleotide</i>)
ATP:	Adenosina trifosfato
ATR:	ATP:cobalamin adenosiltransferasa
BPS:	Secuencia de ramificación (<i>branch point sequence</i>)
cDNA:	DNA complementario
CNCbl:	Cianocobalamina
Cp:	Punto de corte (<i>crossing point</i>)
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTP:	Desoxinucleótido trifosfato
EJC:	Complejo de unión a exon-exon (<i>exon junction complex</i>)
ESE:	Secuencia exónica activadora de <i>splicing</i> (<i>exonic splicing enhancer</i>)
ESS:	Secuencia exónica silenciadora de <i>splicing</i> (<i>exonic splicing silencer</i>)
FBS:	Suero fetal bovino
gDNA :	DNA genómico
GTP:	Guanosina trifosfato
Hcys:	Homocisteína
hnRNPs:	Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares
Kb:	Kilobase
KDa:	Kilodalton
MeCbli:	Metilcobalamina
MCEE:	Metilmalonil CoA epimerasa
MCM:	Metilmalonil CoA-mutasa
MEM:	Medio mínimo esencial de Tagle
MMA:	Acidemia metilmalónica
MMAuria:	Aciduria metilmalónica
MMCoA:	Metilmalonil Coenzima A
mRNA:	RNA mensajero
MS:	Metionina sintasa
MTRR:	Metionina sintasa reductasa
NMD:	Sistema de vigilancia de mRNA (<i>nonsense mediated decay</i>)
OHCbl:	Hidroxicobalamina
PAH:	Fenilalanina hidroxilasa
Pb:	Par de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB:	Banco de datos de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
Proteína SR:	Proteína reguladora de <i>splicing</i> (<i>serine-arginine protein</i>)
PTC:	Codon de parada prematuro (<i>premature terminal codon</i>)
qRT-PCR:	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RNA:	Ácido ribonucleico
RQ:	Cuantificación relativa (<i>relative quantity</i>)
RT-PCR:	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
SINE:	Secuencia repetitiva móvil (<i>short interspersed nuclear elements</i>)
SNP:	Polimorfismo de único nucleótido (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
snRNPs:	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares
SURF:	Complejo de supervigilancia
TCII:	Transcobalamina II

WT: Salvaje o normal (*wild type*)

Algunos términos ingleses, ampliamente utilizados en biología molecular y sin clara traducción en castellano, se muestran en cursiva.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Defectos en el metabolismo celular de cobalaminas.

1.1.1 Aciduria metilmalónica aislada.

1.1.2 Homocistinuria.

1.2 Análisis funcional de variantes alélicas. Nuevas aproximaciones terapéuticas.

1.3 Relación genotipo-fenotipo.

2. OBJETIVOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales.

3.1.1 Reactivos y aparatos.

3.1.2 Material biológico: Pacientes, líneas celulares establecidas y vectores plasmídicos.

3.2 Métodos

3.2.1 Aislamiento de ácidos nucleicos

3.2.2 Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos

3.2.3 Cultivo celular

3.2.4 Cuantificación de mRNA mediante qRT-PCR

3.2.5 Construcción de minigenes y análisis *in vitro* de *splicing*

3.2.6 Transfección de oligonucleótidos antisentido tipo morfolinos y Vivo-Morfolinos en fibroblastos.

3.2.7 Análisis por microarray

3.2.8 Medida del stress celular

3.2.9 Soporte informático

4. RESULTADOS

4.1 Análisis genético en pacientes con aciduria metilmalónica aislada tipo *mut*, *cblB* y *cblA* y combinada con homocistinuria tipo *cblE*.

4.1.1 Análisis de mutaciones en el gen MMAA.

4.1.2 Análisis de mutaciones en el gen MMAB.

4.1.3 Análisis de mutaciones en el gen MUT.

4.1.4 Análisis de mutaciones en el gen MTRR.

4.2 Estudios funcionales y estructurales de mutaciones identificadas en pacientes con aciduria metilmalónica aislada.

4.2.1 Análisis del efecto de las mutaciones en la estabilidad del mRNA.

4.2.2 Estudios funcionales de mutaciones localizadas en secuencias conservadas de *splicing*.

4.2.2.1 Estudio de la mutación c.291-1G>A (paciente 13469)

4.2.2.2 Estudio de la mutación c.584G>A (pacientes 19235 y 19244)

4.2.2.3 Estudio de la mutación c.562G>C (paciente 21431)

4.2.3 Estudios funcionales de mutaciones localizadas en el interior de intrones.

4.3 Terapias moduladoras de mutaciones de *splicing* en aciduria metilmalónica.

4.3.1 Restauración del *splicing* correcto utilizando oligonucleótidos antisentido.

4.3.2 Restauración de la actividad enzimática MCM en líneas de fibroblastos de pacientes.

4.3.3 Análisis del efecto de transfección sobre el *stress* celular.

5. DISCUSIÓN

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFÍA

8. PUBLICACIONES

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DEFECTOS EN EL METABOLISMO CELULAR DE COBALAMINAS.

La B₁₂ o cobalamina es una vitamina que actúa de cofactor de la metilmalonil-CoA mutasa (MCM, EC: 5.4.99.2) que cataliza la transformación de metilmalonil-CoA en succinilCoA y de la metionina sintasa (MS, EC: 2.1.1.14) que cataliza la metilación de la homocisteína para generar metionina. Hasta la fecha, se han definido 8 defectos en la vía intracelular de la cobalamina mediante estudios de complementación celular somática: *cblA*, *cblB*, *cblC*, *cblD*, *cblE*, *cblF*, *cblG* y *mut* (Figura 1). Dependiendo de su localización en la vía, estos defectos pueden causar **homocistinuria aislada** (*cblD*-homocistinuria, *cblE* y *cblG*), **aciduria metilmalónica aislada** (*cblA*, *cblB*, aciduria metilmalónica-*cblD* y *mut*) o **aciduria metilmalónica combinada con homocistinuria** (*cblC*, *cblD*-combinada y *cblF*). Aunque aún no se conocen las funciones de todas las proteínas implicadas, todos los genes han sido identificados y han sido descritas mutaciones causantes de enfermedad en todos ellos. Los diferentes defectos genéticos pueden ser distinguidos mediante estudios bioquímicos, enzimáticos y de complementación celular genética como se detalla en la Tabla 1.

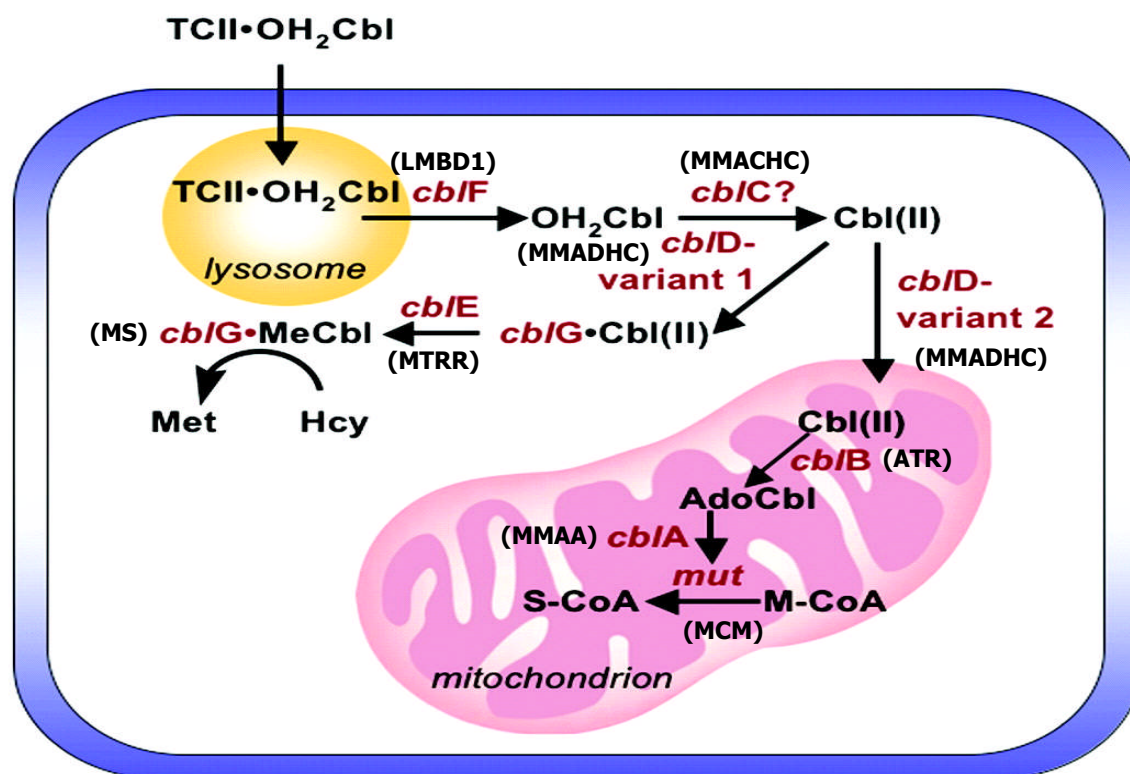


Figura 1: Metabolismo celular de la cobalamina. Se indican los distintos grupos de complementación celular y las proteínas implicadas en el metabolismo celular de la vitamina B₁₂ o cobalamina.

En el proceso de transformación de la B₁₂ a sus formas coenzimáticamente activas, metilcobalamina (Mecbl) y adenosilcobalamina (Adocbl), la cobalamina unida a la transcobalamina II (TCII) es endocitada al lisosoma donde el cofactor es liberado y la TCII y su receptor son reciclados. En el ambiente ácido del lisosoma, la concentración de la cobalamina aumenta y es transportada fuera a través del transportador LMBD1, que es deficiente en líneas pertenecientes al grupo de

complementación *cblF*. La proteína MMACHC responsable del grupo de complementación *cblC*, parece que abre la compuerta del transportador lisosomal unido a la cobalamina. Esta se transfiere a la proteína MMADHC asociada con el defecto *cblD* que transfiere el cofactor en su forma de oxidoreducción adecuada a sus dianas mitocondrial y citosólica. El mecanismo por el cual la cobalamina atraviesa la membrana mitocondrial aún no se conoce. Dentro de la mitocondria el enzima ATP:cob(I)alamina adenosiltransferasa (ATR) asociada al grupo de complementación *cblB* convierte la cobalamina reducida (Cbl⁰) a su forma activa adenosilcobalamina (AdoCbl), que es el cofactor de la metilmalonil-CoA mutasa (MCM), enzima que cataliza la transformación de L-metilmalonil-CoA en succinil-CoA, que podrá ser sustrato de la ruta de degradación de los ácidos tricarboxílicos. Defectos en el gen que codifica para la apoenzima MCM son responsables del grupo de complementación *mut*. Finalmente la proteína MMAA responsable del grupo de complementación *cblA* parece que podría estar implicado en el mantenimiento de la forma activa de la MCM (Banerjee, 2006). En la vía citosólica la cobalamina cedida en su forma de oxidorreducción adecuada por la MMADHC, se transforma a partir del grupo metilo cedido por el 5-metilentetrahidrofolato en metilcobalamina (Mecbl) que es el coenzima de la metionina sintasa (MS) que cataliza la transferencia de un grupo metilo desde el 5-metilentetrahidrofolato a la homocisteína para sintetizar metionina (Rosenblat y Fenton 2001; Watkins y Rosenblat 1989). La enzima metionina sintasa reductasa (MTRR) mantiene a la MS en su forma de oxidorreducción adecuada. Defectos en los genes que codifican para la apoenzima MS y la proteína MTRR son responsables de los grupos de complementación *cblG* y *cblE* respectivamente (Figura 1).

1.1.1 ACIDURIA METILMALÓNICA AISLADA

La **acidemia metilmalónica aislada (MMA) o aciduria metilmalónica (MMAuria)** es una enfermedad metabólica genéticamente heterogénea, de herencia autosómica recesiva, que como su nombre indica se caracteriza por la acumulación de ácido metilmalónico y metabolitos derivados del mismo en sangre y orina. No es posible definir con precisión la prevalencia de esta enfermedad en la población general. Según estudios publicados podría rondar 1:50.000 (Coulombe, et al., 1981) aunque esta frecuencia podría estar subestimada ya que, hasta el momento, el *screening* neonatal de enfermedades no cubre esta deficiencia en todos los países y se sabe que muchos niños con MMA mueren sin diagnosticar en la primera semana de vida por cetoacidosis y/o hiperamonemia.

El D-metilmalonil-CoA (MMCoA) es un metabolito clave en la vía de oxidación del propionato el cual proviene de la degradación de cuatro aminoácidos (valina, isoleucina, treonina y metionina), de los ácidos grasos de cadena impar y de la cadena lateral del colesterol. El D-metilmalonil-CoA es convertido en succinil-CoA que se integra en el ciclo de Krebs, pasando por su forma L por la acción sucesiva de la

metilmalonil CoA epimerasa (MCEE; EC: 5.1.99.1) y la metilmalonil-CoA mutasa (MCM; EC: 5.4.99.2). Esta enzima requiere adenosilcobalamina como coenzima así que la integridad del metabolismo del ácido metilmalónico va unido a la vitamina B₁₂ (cobalamina) y a su adecuado aporte, transporte y utilización. Cualquiera de los defectos en el apoenzima o en genes implicados en el transporte o síntesis del cofactor activo AdoCbl causan aciduria metilmalónica (figura 1)

Tabla 1: Grupos de complementación definidos en el metabolismo intracelular de cobalaminas.

Grupo de complementación	Síntesis afectada	Gen / proteína (MIM *)
ACIDURIA METILMALÓNICA AISLADA		
<i>mut⁰/mut⁻</i>	Apoenzima	MUT/MCM (MIM 251000)
<i>cblA</i>	AdoCbl	MMAA/MMAA (MIM 251100)
<i>cblB</i>	AdoCbl	MMAB/ATR (MIM 251110)
<i>cblD-var2</i>	AdoCbl	MMADHC/MMADHC (MIM 277410)
HOMOCISTINURIA		
<i>cblD-var1</i>	MeCbl	MMADHC/MMADHC (MIM 277410)
<i>cblE</i>	MeCbl	MTRR/MSR (MIM 236270)
<i>cblG</i>	MeCbl	MTR/MS (MIM 250940)
ACIDURIA METILMALÓNICA CON HOMOCISTINURIA		
<i>cblC</i>	AdoCbl, MeCbl	MMACHC/MMACHC (MIM 277400)
<i>cblF</i>	AdoCbl, MeCbl	LMBRD1/LMBRD1 (MIM 277380)

* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>

Los síntomas más comunes de la MMAuria son letargia, fallo en el desarrollo, vómitos recurrentes, deshidratación, problemas respiratorios e hipotonía muscular, existiendo pequeñas diferencias entre los distintos grupos de complementación y en otras manifestaciones clínicas menos predominantes como retraso del crecimiento y/o psicomotor, fallo renal, hepatomegalia o coma (Fenton, et al., 2001).

Existen dos tipos de defectos en la deficiencia del apoenzima mutasa que corresponde con el grupo de complementación *mut*. En uno de ellos, designado *mut⁰* y que constituye dos tercios aproximadamente del grupo de complementación *mut*, la actividad mutasa en extractos de fibroblastos en cultivo es indetectable (<0.1% del control), incluso en ensayos con concentraciones de AdoCbl muy por encima de las

requeridas normalmente para saturar el enzima (Willard and Rosenberg, 1977; Willard and Rosenberg, 1980; Morrow, et al., 1975). Las formas *mut⁰* no responden a B₁₂ *in vitro*, como se observa en células cultivadas en presencia de hidroxicobalamina (OH-Cbl) en el medio, donde estudios de incorporación de propionato resultan en niveles indetectables de actividad (Willard and Rosenberg, 1977). Por análisis inmunohistoquímicos del enzima MCM, se ha visto que algunos pacientes *mut⁰* no presentan niveles detectables de la proteína en condiciones estacionarias, mientras que otros presentan cantidades reducidas que pueden oscilar entre el 1% y el 40% respecto al control (Kolhouse, et al., 1981).

El segundo tipo, *mut⁻*, hace referencia a una apoenzima mutasa variante de Km o anormal estructuralmente. Estas apoenzimas mutantes muestran una Km normal para el metilmalonil-CoA y pueden presentar alguna de estas características: respuesta positiva a B₁₂ *in vitro* (presentan una actividad residual en la incorporación de propionato a proteína estimulada por OH-Cbl que varía entre el 2% y el 75% respecto a la control), tienen menor afinidad por AdoCbl con una Km desde 200 a 5000 veces la normal, y/o exhiben una mayor termolabilidad en relación al enzima control (Fenton, et al., 2001; Morrow, et al., 1975; Willard and Rosenberg, 1977; Willard and Rosenberg, 1980).

La metilmalonil-CoA mutasa es una enzima de localización mitocondrial. El gen MUT en humanos se expresa de forma ubicua en todos los tejidos (Fenton, et al., 2001). Tanto el cDNA como el DNA genómico que codifican la mutasa humana han sido clonados y caracterizados. El cDNA completo del gen mide aproximadamente 2.7kb (Jansen, et al., 1989; Ledley, et al., 1988) y codifica para una proteína de 750 aminoácidos. Análisis por *Southern blot* y técnicas de hibridación *in situ* han mapeado el gen humano para la mutasa y el locus *MUT* correspondiente en el brazo corto del cromosoma 6, exactamente en la región 6p12-p21.2 (Ledley, et al., 1988). La estructura genómica del gen *MUT* contiene 13 exones (Nham, et al., 1990) que se extienden a lo largo de más de 32kb en el DNA genómico, siendo el exón 1 no codificante.

La proteína MCM es un homodímero con dos dominios funcionales diferenciados. Una zona de unión a sustrato localizada en la zona amino terminal de la proteína (residuos 88-422) y el sitio de unión de la AdoCbl localizado en la región carboxilo terminal (residuos 578-750), ambos conectados por una región central (residuos 423-577) (Fenton, et al., 2001). La proteína MCM homóloga a la humana del microorganismo *Propionibacterium shermanii* ha sido purificada, clonada y sobreexpresada en *E.coli* y consiste en un heterodímero $\alpha\beta$ con una única subunidad activa (α) que es la que se une a la AdoCbl (Francalanci, et al., 1986). La secuencia aminoacídica de la subunidad α es aproximadamente un 65% idéntica (75% similitud) a la enzima humana, con muchas de las sustituciones no conservadas presentes en la región N-terminal de menor identidad (40%) (Thoma and Leadlay, 1996). La cristalización de varias formas de la mutasa de *P. shermanii* y la resolución de sus

estructuras (códigos PDB: 1REQ-5REQ) ha permitido localizar estructuralmente los residuos afectados por las mutaciones causantes de MMA en humanos, proporcionando información sobre las posibles consecuencias que tales cambios pueden tener sobre el plegamiento proteico y convirtiéndose en una herramienta indispensable para predecir el efecto de dichas mutaciones (Mancia and Evans, 1998; Mancia, et al., 1996; Thoma and Leadlay, 1996).

Se han descrito más de 200 mutaciones en el gen *MUT*, la mayoría de ellas privadas aunque algunas ocurren entre el 10-20% de los alelos mutantes (Acquaviva, et al., 2005; Lempp, et al., 2007) y algunas están asociadas a determinados grupos étnicos (Worgan, et al., 2006). Aproximadamente un 75% de las mutaciones encontradas son clasificadas como *mut*⁰, mientras que sólo un 25% es reportado como *mut*⁻. Las mutaciones se clasifican en los grupos fenotípicos *mut*⁰ o *mut*⁻ mediante estudios de estimulación con OHCbl en líneas celulares de los pacientes, pudiendo asignarlas en los pacientes homocigotos o funcionalmente hemicigotos. Entre las mutaciones *mut*⁰ además de los cambios nucleotídicos que producen codones de parada prematuros se encuentran las mutaciones p.Y219N, p.R108C, p.A191E, entre otras y entre las *mut*⁻ podemos distinguir varias localizadas en el dominio carboxiterminal de la proteína donde se localiza el dominio de unión a cobalamina y otras localizadas en otras regiones (p.A324T, p.Y316C, p.W105R, por poner algunos ejemplos). Con respecto a la clínica, los pacientes *mut*⁻ son de presentación más tardía que los pacientes *mut*⁰ (Acquaviva, et al., 2005; Fowler, et al., 2008; Worgan, et al., 2006).

En los últimos años, los genes responsables de las formas *cblA*, *cblB* y *cblD* de MMA han sido caracterizados a través del examen de reordenamientos de genes procarióticos en el caso de los genes *MMAA* (MIM# 607481) y *MMAB* (MIM# 607568) respectivamente (Dobson, et al., 2002a; Dobson, et al., 2002b; Leal, et al., 2003) y mediante transfección de cromosomas en *microcells* y mapeo genético (Coelho, et al., 2008). La identificación de estos genes ha abierto la vía para el diagnóstico genético de la MMA aislada por defectos en la síntesis de AdoCbl, habiendo sido descritas mutaciones en los genes *MMAA*, *MMAB* y *MMADHC* que confirman el fenotipo *cblA*, *cblB* y *cblD* en los pacientes (Dobson, et al., 2002a; Dobson, et al., 2002b; Lerner-Ellis, et al., 2004; Yang, et al., 2004; Coelho, et al., 2008)

Bioquímicamente, los fibroblastos en cultivo de pacientes *cblA* presentan una síntesis reducida de AdoCbl con niveles normales de MeCbl, así como una menor capacidad de incorporar propionato a macromoléculas celulares, capacidad que se ve aumentada, generalmente en su totalidad, en presencia de OH-Cbl en el medio de cultivo. Asimismo, medidas directas *in vitro* de la actividad MCM en presencia de AdoCbl en extractos celulares de pacientes *cblA* muestran unos niveles normales comparables al control. Datos similares se recogen en el grupo de complementación

cblB y sin embargo estos pacientes manifiestan una menor respuesta *in vitro* (a veces nula) a la suplementación con OH-Cbl que los *cblA*.

El gen responsable del grupo de complementación *cblA* en humanos, designado como *MMAA*, mapea en el locus 4q31.1-q31.2 y contiene 7 exones (6 de ellos codificantes) que se extienden aproximadamente 17,1 kb en el DNA genómico. Todas las mutaciones *MMAA* reportadas hasta el momento han sido identificadas entre los exones 2 y 7, ninguna en el exón 1, el cual probablemente no sea traducido debido a la presencia de un codon de parada de traducción en fase que precede al primer ATG en fase en el exón 2. El gen *MMAA* puede dar lugar a la transcripción de tres mensajeros de distinta longitud (1,4 kb, 2,6 kb y 5,5 kb). Análisis por *Northern blot* revelan una expresión casi ubicua de los tres transcritos, con una expresión preferencial en hígado del fragmento de menor tamaño (1,4 kb) y en músculo esquelético del de 5,5 kb. A pesar de esta diferencia, parece que los tres mRNAs se traducen todos en una supuesta proteína de 418 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 46,5 kDa y que contiene un sitio de corte para una secuencia líder mitocondrial amino terminal, dos motivos de unión a ATP (*Walker A* y *Walker B*), un motivo de unión a Mg^{2+} y otro a GTP. Estudios de homología revelan que la proteína humana presenta un 78,8% de identidad de secuencia con la *MMAA* de ratón. Se han propuesto dos funciones para la proteína *MMAA*, basadas en su homología con proteínas bacterianas: un papel en el transporte de la vitamina B_{12} a la mitocondria (Dobson, et al., 2002b) y la protección o reactivación de la MCM (Korotkova and Lidstrom, 2004).

De las mutaciones reportadas hasta el momento, una de las más frecuentes es c.433C>T (p.R145X), y se encuentra tanto en homocigosis como en heterocigosis, y para los pacientes homocigotos reportados hasta ahora, la edad de presentación varía desde el período neonatal hasta los 10 años de edad. Un dato interesante es que de todos los errores congénitos del metabolismo de la vitamina B_{12} , los pacientes *cblA* son los que mejor responden clínicamente a la suplementación con vitamina B_{12} (Lerner-Ellis, et al., 2004; Fowler, et al., 2008).

El paso final en la conversión de la vitamina B_{12} a la forma coenzimáticamente activa, AdoCbl, es catalizado por una ATP: cob(I)alamina adenosiltransferasa mitocondrial (ATR, EC 2.5.1.17) (Dobson, et al., 2002a; Fenton and Rosenberg, 1981; Leal, et al., 2003). Defectos en esta enzima son responsables del grupo de complementación *cblB*. Pacientes pertenecientes a este grupo presentan mutaciones en el gen *MMAB* (Dobson, et al., 2002a) y una expresión alterada de la proteína (Leal, et al., 2003).

El gen responsable del grupo de complementación *cblB* en humanos se designa como *MMAB* y se localiza en el cromosoma 12 (12q24) a lo largo de 18.87kb y se transcribe en un mRNA de 1.1kb, preferentemente en hígado y músculo esquelético. El

gen consta de 9 exones que codifican para una pequeña proteína de 250 aminoácidos y aproximadamente 27.3kDa de peso molecular y presenta una elevada similitud a otras cob(I)alamina-adenosiltransferasas (88% idéntica a la secuencia de ratón). Recientemente se ha descrito la estructura cristalina de la secuencia MMAB homóloga de *Thermoplasma acidophilum* (TA1434) y la humana (Schubert and Hill, 2006) y varias mutaciones han sido mapeadas en residuos altamente conservados, localizados en el sitio activo situado en la unión entre subunidades (Saridakis, et al., 2004). p.R186W, p.R186Q, p.R190C, p.R190H y p.R191W son algunas de las mutaciones que alteran estos residuos altamente conservados.

Una de las mutaciones más frecuentes, c.556C>T (p.R186W) está relacionada, cuando aparece en homocigosis, con una presentación de los síntomas en el primer año de vida. Los pacientes que portaban esta mutación son casi exclusivamente de ascendencia europea y comparten un haplotipo común en el gen *MMAB*, consistente con un único evento mutacional.

En general, los pacientes *chlB* tienen una evolución clínica más severa y una menor respuesta a la terapia con B₁₂ que los pacientes *chlA*. La mayoría de las mutaciones *missense* identificadas en pacientes *chlB* afectan el supuesto sitio activo de la adenosiltransferasa, causando o bien una proteína truncada o una proteína con defectos en el sitio activo. Esto se puede reflejar en parte en el contenido en GC y la naturaleza repetitiva del exón 7, que codifica parte del centro activo de la enzima (Lerner-Ellis, et al., 2006).

El gen responsable del grupo de complementación *chlD* se ha localizado en el cromosoma 2q23.2 y designado como *MMADHC*. Se predice que la proteína MMADHC tiene homología de secuencia con un transportador bacteriano con un cassette de unión a ATP y contiene un supuesto motivo de unión a cobalamina y una secuencia de dirección a la mitocondria. Un análisis completo de este gen podría explicar cómo mutaciones en este gen pueden generar 3 fenotipos bioquímicos diferentes: aciduria metilmalónica-*chlD*, *chlD*-homocistinuria y *chlD*-combinada. La naturaleza y la localización de las mutaciones en el gen *MMADHC* se correlacionan con el fenotipo bioquímico (figura 2), así, mutaciones, en todos los casos del tipo *nonsense* o *frameshift*, localizadas en el N-terminal de la proteína están asociadas a MMAuria mientras que mutaciones encontradas en pacientes con *chlD*-homocistinuria estaban localizadas en el extremo C-terminal y consistían en mutaciones del tipo *missense*. En pacientes con *chl*- combinada (MMAuria y homocistinuria) se encontraron mutaciones en el extremo C-terminal, pero todas eran mutaciones *nonsense*. Una posible explicación podría ser que el gen *MMADHC* tuviera un segundo codon de iniciación que da lugar a una proteína MMADHC más corta, pero funcional, a la que le falta la secuencia líder mitocondrial y que funciona de forma normal para la síntesis de MeCbl en el citosol. Los pacientes con *chlD*-homocistinuria son portadores de mutaciones *missense* que son

suficientes para causar una síntesis deficiente de MeCbl y síntesis normal de AdoCbl, sin embargo, se especula que estas mutaciones hacen que se forme una proteína modificada con el dominio funcional de síntesis de AdoCbl intacto; mientras que para los pacientes con *cbID*-combinada se especula que las mutaciones darán lugar a codon de stop prematuros, por lo que resultarían en proteínas sin ninguno de los dos dominios funcionales o en una baja cantidad de mRNA de *MMADHC* debido al mecanismo de NMD (Coelho, et al., 2008). Para explicar estas asociaciones se requieren más experimentos, sin embargo, proponen que la metionina 62 puede actuar como codon de re-iniciación, resultando en una proteína *cbID* más corta pero funcional que no tiene el péptido señal mitocondrial pero permite la síntesis normal de MeCbl en el citoplasma. Existe una secuencia consenso Kozak fuerte (Kozak, 1986) en las posiciones 184-3 y 184+4 en el gen *MMADHC* que apoyaría esta hipótesis.

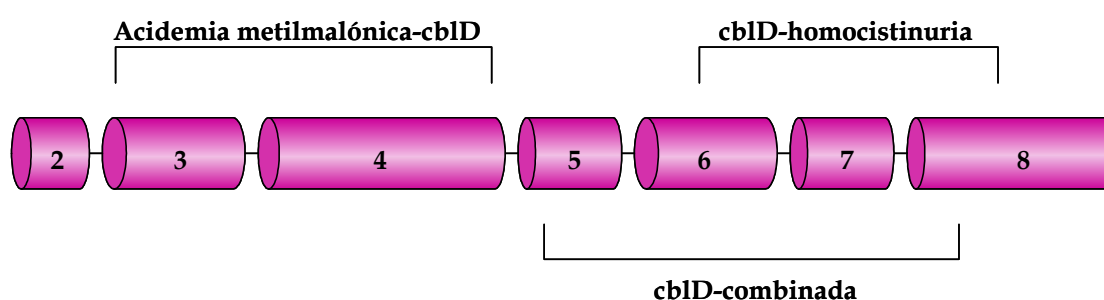


Figura 2: Organización estructural y localización de mutaciones en el gen *MMADHC*. Los exones están representados por las cajas numeradas y se ha señalado dónde se encuentran las mutaciones con respecto al fenotipo.

En cuanto al fenotipo clínico de la aciduria metilmalónica los pacientes pertenecientes a la clase *mut*⁰ suelen presentar una **forma neonatal** de la enfermedad; se manifiestan más temprano, normalmente durante la primera semana de vida, y suelen morir en los primeros meses o años con graves descompensaciones metabólicas. Por el contrario, la **presentación infantil o tardía** presenta los síntomas después del primer mes de vida, en la infancia, es más común en pacientes de los otros grupos *mut*⁻, *cbIA* y *cbIB*, algunos de los cuales llegan incluso a la adolescencia (Fenton, et al., 2001)

Existen dos tipos de tratamiento para niños con MMAuria que utilizados conjuntamente deberían ser útiles para disminuir los niveles circulantes de metilmalonato y propionato y mejorar la evolución clínica y desarrollo de estos pacientes y que deben ser instaurados tan pronto aparezcan los primeros síntomas o se sospeche el diagnóstico de MMA (Nyhan, et al., 1973; Satoh, et al., 1981). Este tratamiento consiste en una dieta restringida en proteínas (o una fórmula especial restringida en los precursores aminoácidos de metilmalonato) y un suplemento farmacológico de cobalamina, bien cianocobalamina (CNcbl) o preferiblemente hidroxycobalamina (OHCbl) intramuscular inyectada durante varios días.

Tanto la respuesta bioquímica y clínica a la suplementación con cobalamina como la evolución a largo plazo de la enfermedad en los pacientes afectados con MMAuria dependen considerablemente del gen afectado y de la naturaleza de la lesión genética responsable de la MMA (Matsui, et al., 1983; Fowler, et al., 2008; Horster, et al., 2007). Esencialmente ninguno de los niños designados como *mut*⁰ o *mut*⁻ responde *in vivo* a la terapia con vitamina B₁₂, mientras que el 90% de los pacientes *cblA* y aproximadamente el 40% de los *cblB* sí manifiestan un efecto positivo mostrando un descenso en las concentraciones de metilmalónico en sangre y orina en respuesta a la suplementación con OH-Cbl. Los pacientes con defectos en el gen *MMADHC* presentan una respuesta variable a la vitamina, aunque no existen todavía suficientes pacientes reportados. Sin embargo, cabe destacar que la respuesta clínica *in vivo* no supone la corrección completa de la deficiencia en la MCM y generalmente no se produce una reversión de los síntomas neurológicos. Incluso en pacientes donde la mejora clínica fue espectacular como en muchos *cblA*, la administración de OHCbl sólo reduce, que no elimina, la excreción de metilmalonato.

1.1.2 HOMOCISTINURIA

La deficiencia en *MS* y *MTRR*, responsables de los grupos de complementación *cblE* y *cblG*, resultan en la acumulación de **homocisteína (Hcys)** en sangre y orina y niveles disminuidos de metionina en sangre. Los desórdenes asociados con estos grupos de complementación son virtualmente idénticos. Ambos se presentan con un amplio rango de anormalidades clínicas que incluyen fallos respiratorios, anemia megaloblástica, retraso del desarrollo, ataxia y atrofia cerebral con anormalidades en la materia blanca. (Rosenblatt, 2001; Zavad'akova, et al., 2002). El tratamiento consiste en hidroxicobalamina, folato, betaina y L-metionina. Esto resulta en una desaparición rápida de las anormalidades bioquímicas y hematológicas. Sin embargo, los síntomas neurológicos responden más despacio al tratamiento y algunos persisten (Whitehead, 2006).

El gen que codifica para la proteína metionina sintasa (*MTR*) mapea en 1q43 cerca del telómero del cromosoma 1. La proteína contiene secuencias altamente similares a la proteína identificada en cerdo y es 55% y 64% idéntica que las de *E.coli* y *C. elegans* respectivamente. La proteína contiene 1265 aminoácidos y un peso molecular de 140KDa. El gen responsable del grupo de complementación *cblE*, designado *MTRR*, mapea en 5p15.2-15.3 y su cDNA mide aproximadamente 3.6kb. La proteína contiene 689 aminoácidos y un peso molecular de 77KDa.

1.2 ANALISIS FUNCIONAL DE VARIANTES ALÉLICAS. NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS.

La posibilidad de obtener información clínica relevante sobre la severidad fenotípica de una enfermedad genética humana a partir del genotipo del paciente, es el motor que impulsa los cada vez más numerosos análisis de expresión de mutaciones identificadas en los diferentes genes. Los patrones que permiten establecer una correcta correlación genotipo-fenotipo surgen de la información acumulada sobre el efecto que cada mutación produce, no sólo referente a su severidad sino también en términos de su mecanismo de acción, obtenida de los estudios de expresión. El conocimiento de estos mecanismos de acción ha abierto nuevas y prometedoras vías terapéuticas tanto genéticas, evitando la expresión de determinados transcritos mutantes con oligonucleótidos antisentido (AONs) y RNA de interferencia (RNAi), como farmacológicas utilizando vitaminas, cofactores o drogas sintéticas, que actúan como chaperonas químicas o naturales así como efectores transcripcionales (ácido valproico, butirato sódico, etc.) que pueden modular la expresión de mutaciones de *splicing* o evitar los efectos causados por las mutaciones de parada prematura de la traducción como el caso de los antibióticos aminoglucósidos.

En general, las mutaciones que dan lugar a codones de parada prematuros de la traducción o **mutaciones PTC** (*premature termination codon*), lejanos del sitio original y que implican eliminación de dominios esenciales para la función proteica son consideradas mutaciones nulas, con actividad residual indetectable. Estas mutaciones son producidas por cambios nucleotídicos (**mutaciones nonsense**), deleciones, inserciones o mutaciones de *splicing* que afectan a la fase de lectura, aunque estas últimas necesitan un tratamiento funcional individualizado. Las mutaciones *nonsense* comprenden un 20.3% de las aproximadamente 43000 sustituciones de un único nucleótido asociadas a enfermedad que afectan a regiones codificantes catalogadas en la *Human Gene Mutation Database*.

Las mutaciones PTC producen sus efectos deletéreos como consecuencia de la producción de niveles insuficientes de proteína completa. La introducción de codones de parada (PTC) de forma tan prematura puede tener multitud de consecuencias, incluyendo el *skipping* de exones, que puede restablecer la fase generando una proteína mas pequeña, o bien la disminución de la estabilidad del mRNA portador del PTC (Mort, et al., 2008). Este mecanismo celular que elimina los mRNA portadores de estos cambios es conocido como **NMD** (*nonsense-mediated decay*) y permite eliminar proteínas con una potencial dominancia negativa, que podrían agregarse y producir un efecto toxico celular (Holbrook, et al., 2004; Wilkinson, 2005; Maquat, 2004). Este sistema degrada, en general, transcritos que presentan PTC localizados a 50-55 nucleótidos corriente arriba de una unión de *splicing* que es reconocida por un sistema proteico denominado EJC (*exon junction complex*), el cual está formado por 12 proteínas.

Cuando el ribosoma comienza la traducción y encuentra un PTC se detiene. Esto permite la formación del complejo SURF, el cual cuando colisiona con el EJC provoca la activación del sistema NMD y con ello, la degradación del mRNA (figura 3).

Según esta regla, solo las mutaciones PTC localizadas en el último exón no serían diana del NMD, sin embargo existe un porcentaje de PTC, entre un 5-25%, que aun cumpliendo la regla 50-55 escapan al mecanismo NMD, generando proteínas truncadas con posible actividad residual. Este fenómeno se ha descrito asociado a determinados genes y asociado a diferencias intertisulares e interindividuales lo que lo convierte en un modificador del fenotipo (Kuzmiak and Maquat, 2006; Chang, et al., 2007; Maquat, 2005; Kuzmiak and Maquat, 2006; Isken and Maquat, 2007; Kerr, et al., 2001). En base a esto se han creado nuevas terapias basadas en la inhibición del sistema NMD que consiguen recuperar el fenotipo normal *in vitro* en enfermedades como la enfermedad de Ullrich (Usuki, et al., 2004; Usuki, et al., 2006).

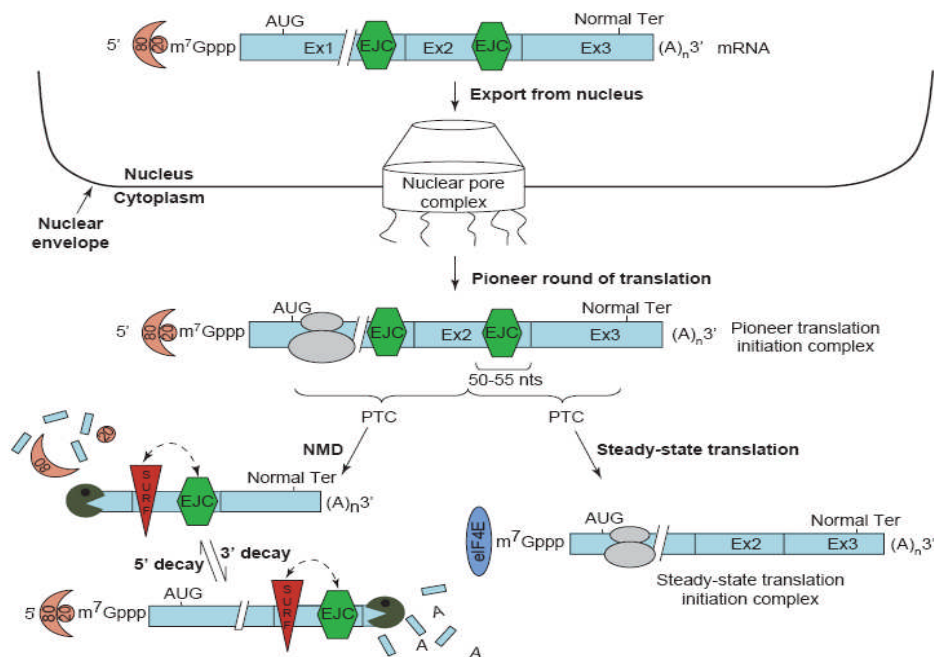


Figura 3. Esquema del mecanismo de actuación del sistema NMD. Se indica un PTC localizado antes de 50-55 nt corriente arriba de una unión exón-exón, que provocaría la activación del sistema NMD y otro localizado posteriormente que se traduciría normalmente. La eliminación de los intrones por el *splicing* da como resultado el posicionamiento a 20-25 nt corriente arriba de la unión exón-exón del complejo EJC. SURF: complejo de supervigilancia que se forma cuando se detiene el ribosoma al encontrar un PTC. Cuando SURF interactúa con EJC se dispara el sistema NMD. Figura adaptada de (Kuzmiak and Maquat, 2006).

Para confirmar si los correspondientes mRNA son sustrato del NMD o bien son inmunes a la degradación es necesario el análisis del perfil transcripcional mediante métodos cuantitativos de mRNA como *Northern blot* y más recientemente mediante RT-PCR cuantitativa con sondas específicas del gen a estudiar. En el caso del *Northern blot*, el mRNA es separado por tamaños, transferido a membranas y analizado utilizando sondas específicas marcadas radiactivamente. En la RT-PCR cuantitativa los transcritos

son cuantificados mediante sondas que hibridan específicamente con los genes a estudiar (TaqMan®, FRET®) o utilizando fluoróforos específicos de DNA de doble cadena como el SybrGreen®. Estas sondas permiten cuantificar los transcritos generados e incluso diseñando oligonucleótidos adecuados se puede cuantificar la cantidad relativa de transcritos normales y mutantes con respecto a un control (Clavero, et al., 2004).

Otro tipo de mutaciones muy frecuentes son los cambios nucleotídicos que afectan al correcto procesamiento del mRNA o *splicing* (Faustino and Cooper, 2003). Aproximadamente un 15% de las mutaciones puntuales asociadas a enfermedades genéticas humanas afectan a este proceso (Cooper, et al., 2006; Krawczak, et al., 1992; Wang, et al., 2005). Estas mutaciones pueden afectar a secuencias conservadas implicadas en el *splicing* (sitio donador 5' de *splicing*, sitio aceptor 3' de *splicing*, la secuencia de ramificación (BPS) y el tracto polipirimidínico) que representan el 60% de estas mutaciones (Nissim-Rafinia and Kerem, 2002), o bien afectar a secuencias reguladoras (Cartegni, et al., 2002; Pagani, et al., 2003). Estas secuencias reguladoras, que se encuentran localizadas tanto en exones como en intrones, pueden actuar o bien estimulando la eliminación intrónica (potenciadores de *splicing* o *enhancers*) o bien impidiéndola (silenciadores de *splicing*) (Blencowe, 2000). Las secuencias conservadas son reconocidas por las partículas ribonucleoproteicas (snRNPs) (U1, U2, U4, U5 y U6) que forman el *spliceosoma* junto con más de 50 proteínas, y los elementos reguladores de *splicing* ejercen su acción a través de factores proteicos. En concreto, las secuencias silenciadoras parecen interaccionar con una serie de reguladores negativos, frecuentemente pertenecientes a la familia de las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs). Los *enhancers* exónicos de *splicing* (ESEs) son sitios de unión de factores proteicos ricos en serina y arginina, conocidos como proteínas SR, a través de los cuales realizan su función activadora (Pozzoli and Sironi, 2005). Las proteínas SR están implicadas en el reconocimiento de los sitios 5' y 3' de *splicing* y en la comunicación entre ambos, en el reclutamiento y constitución del *spliceosoma* funcional y en el reconocimiento de *enhancers* (Bourgeois, et al., 2004). Asimismo, pueden ejercer su acción positiva en el reconocimiento de un exón a través de su unión al RNA mensajero, al impedir que reguladores negativos se unan a un silenciador próximo (competición e impedimento estérico) (Pozzoli and Sironi, 2005).

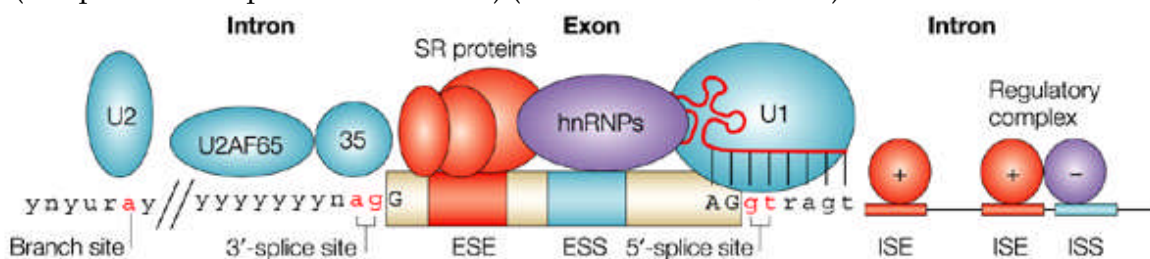


Figura 4: Representación esquemática de las secuencias, proteínas y factores que intervienen en el proceso de *splicing*. Las señales esenciales de *splicing* que definen las uniones entre exones son relativamente cortas. Sólo los dinucleótidos GU y AG que directamente flanquean los exones (en el 3' y en el 5', respectivamente) y la adenosina del punto de ramificación (en rojo) están siempre conservados. En la

mayoría de los casos existe un tracto polipirimidínico de longitud variable (el símbolo consenso “y” representa una base pirimidínica, citosina o timina) aguas arriba del sitio 3’ de *splicing*. El punto de ramificación está típicamente localizado entre 18 y 40 nucleótidos aguas arriba del tracto polipirimidínico. Los componentes de la maquinaria basal de *splicing* se unen a las secuencias consenso y promueven el ensamblaje del complejo de *splicing* (Pagani and Baralle, 2004).

La identificación de las secuencias consenso de unión para factores reguladores de *splicing* (proteínas SR) ha permitido la generación de diferentes programas informáticos como el ESEfinder (<http://exon.cshl.edu/ESE/>) (Cartegni, et al., 2003), SELEX, RESCUE-ESE y PESX (Wang, et al., 2005) mediante los cuales se pueden predecir los posibles ESEs de una secuencia nucleotídica a estudiar (Cartegni and Krainer, 2003; Pozzoli and Sironi, 2005). Estos programas facilitan la identificación de posibles ESEs basándose en su reconocimiento por cuatro proteínas SR: SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55, cuyos motivos consenso de unión se muestran en la siguiente figura.



Figura 5: Motivos de unión para las proteínas SR SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55. La altura de cada letra indica la frecuencia de cada nucleótido en esa posición. En cada posición, los nucleótidos se muestran de arriba a abajo en orden decreciente de frecuencia. Las letras en color naranja indican frecuencias por encima del fondo. <http://exon.cshl.edu/ESE/>

En los últimos años se ha descubierto un mayor número de mutaciones que afectan a secuencias reguladoras de *splicing* como en la fibrosis quística, distrofia miotónica, esclerosis múltiple y otras (Pozzoli and Sironi, 2005) (Pagani, et al., 2003), incluso se han definido ciertas mutaciones puntuales que afectan a secuencias reguladoras de *splicing* y en concreto a ESEs (*exonic splicing enhancers*), y que fueron incorrectamente clasificadas como mutaciones de cambio de aminoácido, mutaciones *nonsense* o incluso polimorfismos silenciosos debido a la ausencia de análisis a nivel de cDNA (RT-PCR) y a la utilización de sistemas de expresión inadecuados (Nielsen, et al., 2007).

Las dos consecuencias más comunes de las mutaciones de *splicing* son el *skipping* **exónico**, eliminación de un exón que no se incluye en el mRNA maduro, y la activación de sitios crípticos cuya consecuencia es la inclusión de secuencias aberrantes o la eliminación de secuencias codificantes. Además, en los intrones existen de manera muy abundante secuencias que portan todos los elementos necesarios para el reconocimiento de la maquinaria de *splicing* pero no se incluyen como exones en el mRNA. Esto es debido, a que a pesar de que estas secuencias poseen buenos valores de *splicing* presentan otros defectos importantes en las regiones potenciadoras del *splicing* además de un enriquecimiento de regiones silenciadoras que impiden su reconocimiento como

exones verdaderos (Sironi, et al., 2004). Estas secuencias son denominadas **pseudoexones**. En los últimos años se han caracterizado diversas enfermedades genéticas causadas por la inclusión de estas secuencias, generalmente debido a mutaciones que provocan la creación *de novo* de un sitio donador o aceptor fuerte de *splicing* seguido de una selección de un aceptor o donador “oportunista” (Coutinho, et al., 2005; Grellscheid and Smith, 2006; Metherell, et al., 2001; Tuffery-Giraud, et al., 2003). Otro motivo por el que estas secuencias pueden ser incluidas como exones es debido a la existencia de mutaciones que causan la creación o delección de secuencias reguladoras de *splicing* (*enhancer* o secuencias silenciadoras tanto exónicas como intrónicas) (Blencowe, 2000; Buratti, et al., 2006; Faustino and Cooper, 2003).

La mayoría de las mutaciones de *splicing* producen un cambio en el marco de lectura dando lugar a una secuencia madura de mRNA con un codón prematuro de terminación (PTC) lejano al sitio original. *A priori*, todas ellas son clasificadas como mutaciones nulas (actividad indetectable), ya que generalmente dan lugar a la disminución de los correspondientes mRNAs evitándose la producción de proteínas truncadas potencialmente tóxicas (Maquat, 2004) mediante NMD. Sin embargo, es necesario validar el efecto que ejercen las variantes de secuencia intrónicas y exónicas sobre el procesamiento del mRNA, utilizando aproximaciones experimentales que impliquen la expresión de regiones discretas del DNA genómico, como son los sistemas celulares modelo de *splicing* que utilizan vectores apropiados para generar los llamados minigenes (Cooper, 2005; Pagani and Baralle, 2004). Los minigenes pueden ser utilizados como herramienta para distintos estudios como son la determinación del grado de reconocimiento de los sitios de *splicing*, la identificación de elementos exónicos o intrónicos que activan o reprimen al *splicing*, la identificación de variante alélicas que tienen un efecto en la eficiencia del *splicing* y la identificación de elementos requeridos para la regulación por factores específicos.

El conocimiento de las consecuencias que cada mutación produce en términos de su mecanismo de acción a nivel de DNA y mRNA ha abierto nuevas y prometedoras vías terapéuticas genéticas en estas alteraciones del *splicing* (Tazi, et al., 2009; Wood, et al., 2007). La modulación del *splicing* permitiría modificar el porcentaje de transcritos incorrectamente procesados y por lo tanto, alterar la expresión fenotípica de la mutación. Esto se podría llevar a cabo mediante el uso de **oligonucleótidos antisentido tipo morfolino** (AMO) (Summerton, 1999). Se trata de pequeñas cadenas de análogos de deoxirribonucleótidos que hibridan con el mRNA complementario por apareamiento de bases formando los heterodúplex AMOs-mRNA (Agrawal and Kandimalla, 2000). Los mecanismos mediante los cuales los AMOs llevan a cabo la regulación de la expresión génica incluyen inducción de la actividad RNasa H, endonucleasa que degrada el mRNA, interferencia de la traducción por impedimento estérico de la actividad ribosomal e interferencia de la maduración del mRNA por inhibición del *splicing* (Aartsma-Rus and van Ommen, 2007; Kurreck, 2003). En los

últimos años los oligonucleótidos antisentido tipo morfolino (AMOs), capaces de bloquear alostéricamente estos sitios de *splicing*, han sido utilizados para restaurar el *splicing* normal en varias enfermedades como son la β -talasemias (Suwanmanee, et al., 2002), fibrosis quística (Friedman, et al., 1999), enfermedad de Menkes (Madsen, et al., 2008), albinismo ocular tipo I (Vetrini, et al., 2006), afibrinogenia (Davis, et al., 2009), distrofia muscular de Duchenne (Aartsma-Rus and van Ommen, 2007), ataxia telangiectasia (Du, et al., 2007).

1.3 RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.

En numerosas enfermedades genéticas, con el conocimiento del espectro mutacional de los genes implicados y teniendo en cuenta la naturaleza de las mutaciones identificadas, la información obtenida en los diferentes estudios de expresión de los alelos mutantes y los datos clínicos y bioquímicos de los pacientes se ha intentado correlacionar el fenotipo con el genotipo para poder predecir, en base a los cambios nucleotídicos, la evolución de los pacientes y así poder adecuar una terapia de forma más individualizada y en algunos casos más dirigida al mecanismo molecular responsable de la patogénesis en cada variante alélica.

La relación genotipo-fenotipo es más clara cuando los pacientes son homocigotos o funcionalmente hemocigotos (portadores de una mutación PTC) y en estos casos se puede clasificar directamente a las mutaciones según su gravedad. Así, en la mayoría de las enfermedades las mutaciones severas, bien por afectar a la fase de lectura de la proteína y generar PTC (deleciones, inserciones) o bien por presentar actividad residual nula *in vitro* (mutaciones funcionales) están asociadas a las formas más graves de la enfermedad. Sin embargo existen inconsistencias entre los genotipos y la presentación y evolución clínica de los pacientes incluso con dos mutaciones PTC.

Un modificador del fenotipo es el sistema de procesamiento de mRNA, existiendo una relación inversa entre los niveles de transcritos normales que se generan producto de las mutaciones de *splicing* y la gravedad de la enfermedad. Tanto la localización de las mutaciones que afectan al correcto procesamiento del mRNA, como las variaciones en la expresión intertisular e interindividual de los factores implicados en el proceso, pueden ser la base de un patrón diferente de *splicing* y por lo tanto pueden ser la base de la variabilidad fenotípica encontrada en muchas enfermedades genéticas, entre ellas las enfermedades metabólicas. Este hecho podría explicar incluso las diferencias entre el fenotipo metabólico de hermanos con idéntico genotipo. Aunque generalmente las mutaciones que afectan a las secuencias intrónicas donadoras yceptoras de *splicing* están asociadas a los fenotipos más graves de la enfermedad debido a la ausencia de transcritos correctamente procesados, existen

ejemplos de cambios en los *ag* o *gt* invariables que se asocian a fenotipos más leves (Nissim-Rafinia and Kerem, 2002).

Las mutaciones *missense* con actividad residual parcial *in vitro*, son clasificadas como mutaciones leves y están generalmente asociadas a los fenotipos menos graves de la enfermedad. Los estudios de expresión de mutaciones de cambio de aminoácido han revelado que dos son los mecanismos más frecuentes a través de los cuales las mutaciones *missense* ejercen sus efectos patogénicos sobre la proteína y son los defectos en la estabilidad (mutaciones estructurales) o en las propiedades catalíticas (mutaciones funcionales), aunque existen mutaciones que ejercen un efecto mixto estructural y funcional (Pey, et al., 2003; Cohen and Kelly, 2003; Gregersen, et al., 2000).

Las discrepancias en la relación genotipo-fenotipo observadas en pacientes portadores de estos cambios se han descrito fundamentalmente en mutaciones que producen una menor cantidad de proteína inmunorreactiva por defectos en el plegamiento y mayor tendencia a la agregación/degradación, por lo que presentan menor actividad cuando son expresadas *in vitro* (Martinez, et al., 2008). Las enfermedades donde se han descrito este tipo de mutaciones son denominadas enfermedades conformacionales. En la fenilcetonuria o en las deficiencias de acil-CoA deshidrogenasas se ha podido predecir, en la mayoría de los casos, el fenotipo bioquímico a partir del genotipo de los pacientes (Martinez, et al., 2008). Sin embargo, determinadas mutaciones presentan una actividad *in vitro* que no se correlaciona con el fenotipo clínico y bioquímico. Estas discrepancias han sido explicadas por diferencias interindividuales en la eficiencia del sistema de degradación/plegamiento de proteínas (*protein quality control*) que mantiene diferentes niveles de actividad residual de enzimas citosólicas como la PAH (Desviat, et al., 2003; Gregersen, et al., 2004; Gregersen, et al., 2001; Martinez, et al., 2008).

La relación genotipo-fenotipo en pacientes heterocigotos para dos mutaciones de cambio de aminoácido, los cuales representan aproximadamente el 80% de los pacientes, es más compleja ya que es necesario valorar la contribución de cada variante alélica en la producción final de proteína funcional. De esta forma se puede definir un sencillo algoritmo en el cual dos mutaciones severas (con actividad residual nula *in vitro*) se asocian a la forma más grave de la enfermedad, y la presencia de una mutación leve, que retiene actividad residual, puede suavizar el fenotipo, aunque volvemos a encontrar inconsistencias asociadas a este tipo de mutaciones que normalmente son estructurales (Desviat, et al., 1999).

En cualquier caso, las discrepancias observadas entre el genotipo mutante y la manifestación fenotípica de las enfermedades genéticas ilustran la idea, cada vez más aceptada en distintas enfermedades monogénicas, de que la expresión del producto de un locus principal no es el único factor responsable de la manifestación del fenotipo

metabólico, sino que existen múltiples factores, tanto genéticos (diferencias intertisulares e interindividuales en la expresión génica de genes implicados en *splicing*, NMD, etc.) como epigenéticos y ambientales, que afectan al fenotipo metabólico y que demuestran el carácter complejo también de los defectos monogénicos (Scriver and Waters, 1999; Dipple and McCabe, 2000a; Dipple and McCabe, 2000b).

2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo ha sido la caracterización genética de pacientes con aciduria metilmalónica aislada y pacientes con homocistinuria aislada así como el análisis funcional y estructural de las variantes alélicas identificadas con el propósito de investigar en nuevas aproximaciones terapéuticas basadas en los mecanismos moleculares de cada variante de secuencia. Para ello, se han seguido los siguientes objetivos concretos:

1. Identificación y caracterización de mutaciones en los genes *MMAA*, *MMAB*, *MUT* y *MTRR* responsables de los grupos de complementación *cblA*, *cblB*, *mut* y *cblE* respectivamente.
2. Análisis funcional de las mutaciones identificadas:
 - a. Análisis del efecto sobre la estabilidad de los correspondientes mRNA de mutaciones identificadas en los genes *MMAA* y *MUT* reponsables de los grupos de complementación *cblA* y *mut*.
 - b. Análisis funcional de cambios nucleotídicos intrónicos y exónicos implicadas en *splicing* mediante estudio del perfil transcripcional en líneas celulares de los pacientes y modelos celulares de *splicing* con minigenes.
3. Investigación en una terapia antisentido dirigida a evitar la inclusión de regiones intrónicas internas identificadas en el gen *MUT*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Reactivos y aparatos

Los reactivos químicos utilizados en este estudio fueron suministrados por: Amersham Pharmacia Biotech, Aldrich, BiotechBio-Rad Laboratories, Cambrex, Difco Laboratorios, Fluka, GibcoBRL, Merck, Panreac Quimica, Perkin-Elmer, Pierce, Pronadisa, Promega, Sigma, Stratagene, Roche Diagnostics.

En el cultivo celular se emplearon los siguientes reactivos: medio mínimo esencial de Eagle (MEM), glutamina de la firma comercial GibcoBRL y suero fetal bovino (FBS) de SIGMA. Los antibióticos fueron suministrados por Antibióticos S.A. La tripsina y los medios de comprobación se obtuvieron de Difco Laboratorios. Invitrogen, GibcoBRL y Gene Tools suministraron los reactivos para las transfecciones de células primarias y establecidas.

Los proveedores de agarosa y agarosa *NuSieve*®GTG® fueron Pronadisa y Cambrex respectivamente. Bio-Rad proporcionó la acrilamida y la bisacrilamida.

Promega e Invitrogen proporcionaron los productos necesarios para la purificación de RNA total. La purificación de productos de PCR y de DNA plasmídico a baja y alta escala se llevó a cabo con los productos de las casas comerciales Promega, Quiagen y Mbiotech. Las firmas comerciales GENTRA Systems, Promega, Invitrogen proporcionaron los productos necesarios para la extracción de DNA genómico.

Los reactivos y enzimas empleados en las reacciones de PCR, RT-PCR, RT-PCR a tiempo real y mutagénesis dirigida fueron obtenidos de las firmas comerciales Applied Biosystem, Invitrogen, Roche y Stratagene y se realizaron en un termociclador Verity de Applied Biosystem.

Las reacciones de secuenciación cíclica directa se llevaron a cabo con productos de Applied Biosystems en un secuenciador *ABI Prism*® 3730 de Applied Biosystems. Los oligonucleótidos sintéticos proceden de la firma comercial Isogen y los oligonucleótidos antisentido tipo morfolinos fueron suministrados por la casa comercial GeneTools.

Las enzimas de restricción fueron proporcionadas por Roche Diagnostics, New England Biolabs y Promega.

3.1.2 Material biológico

Muestras de pacientes.

En este trabajo se han estudiado 21 muestras de pacientes de 20 familias no relacionadas con aciduria metilmalónica aislada y uno con homocistinuria.

Los criterios diagnósticos del laboratorio fueron la presencia persistente y elevada en orina de los ácidos metilmalónico y metilcítrico, hipocarnitinemia y ausencia de homocistinuria en el caso de los pacientes con aciduria metilmalónica. Las acilcarnitinas en plasma se determinaron en algunos casos, confirmando los altos niveles de propionilcarnitina (C3) y el aumento de metilmalonilcarnitina (C4DC). En el caso de los pacientes con homocistinuria el criterio fueron los elevados niveles de homocisteína en sangre y orina.

Todo el material genético (biopsias de piel y sangres) de pacientes y controles se obtuvieron con consentimiento informado autorizado por padres y por el hospital que remitió las muestras. Toda la investigación llevada a cabo con este material está autorizado por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, respeta los principios fundamentales de la declaración de Helsinki, del Convenio del consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y de la declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma Humano y los derechos humanos.

Líneas celulares establecidas.

Se han utilizado varias líneas establecidas para los experimentos descritos en este trabajo. La línea celular de hepatoma utilizado para este estudio fue Hep 3B, cedida por el Dr. S. R. de Córdoba (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid). Las líneas celulares COS7, HeLa y HEK294 utilizadas para este estudio se encontraban en el laboratorio.

Vectores plasmídicos.

Se han utilizado los vectores plasmidicos:

- TOPO TA Cloning PCR 2.1-Topo Vector de Invitrogen.
- pSPL3 de Life Technologies.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Aislamiento de ácidos nucleicos.

Para la **extracción de RNA total** a partir de fibroblastos de piel y de líneas establecidas, se utilizó TriPure Isolation Reagent de Invitrogen.

La **extracción del DNA genómico** a partir de fibroblastos de piel o hepatoma y de sangre total de los distintos pacientes se realizó mediante fenolizaciones (John, et al., 1991), sin embargo de la sangre impregnada en papel se llevó a cabo con el kit Generation DNA Purification Systems de Gentra Systems.

Para la **extracción y purificación de DNA plasmídico** se empleó el sistema comercial de extracción de DNA plasmídico *Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification system* de Promega.

3.2.2 Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

El proceso de RT-PCR se llevó a cabo a partir de 1 µg de RNA total extraído a partir de fibroblastos de piel o hepatoma. Los reactivos empleados en la retrotranscripción y posterior amplificación fueron suministrados por Invitrogen (*SuperScript™III First-Strand Synthesis System for RT-PCR*), utilizando oligodT y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Todos los productos de PCR fueron analizados por secuenciación cíclica directa. En algunos casos, los estudios en cDNA se realizaron en células que se trataron con 100µg/mL de emetina o cicloheximida (Dantas, et al., 2005; Skandalis and Uribe, 2004).

Para los distintos estudios moleculares en cDNA se diseñaron primers específicos para cada gen a partir de la Base de Datos Pública Ensembl <http://www.ensembl.org/index.html> (Tablas 2, 3, 4 y 5).

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del cDNA de los genes *MMAA* y *MMAB*.

GEN	FRAGMENTO cDNA	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5'→3'	T _m (°C)	RT-PCR tamaño
MMAA	A	5'MMAA	CTTCGGGCGGGGAGGTCACAATCACA	69	1359
		3'MMAA	GCATACAAGTGATTTTCTATTAA	53	
	A1	5'MMAA	CTTCGGGCGGGGAGGTCACAATCACA	69	520
		MAA1B	CAATCCTACTCGAAATGCTAG	56	
	A2	MAA1A	CTCACAGCAGGAAAAAGGAG	57	953
		3'MMAA	GCATACAAGTGATTTTCTATTAA	53	
MMAB	B	5'MMAB	GCACGAGGGTCAAGCAGCCTG	66	789
		3'MAB	ATGGAGGGATCCTCCAAGCT	62	
	B1	5'MMAB	GCACGAGGGTCAAGCAGCCTG	66	435
		MAB1B	GAACGTGGTATACTTTAAGTGAGC	60	
	B2	MAB1A	GAACGTGGTATACTTTAAGTGAGC	60	450
		3'MAB	ATGGAGGGATCCTCCAAGCT	62	

Estos oligonucleótidos fueron diseñados utilizando las secuencias de los cDNAs NM_172250 para el mRNA *MMAA* y NM_052845 para el mRNA *MMAB*, depositadas en las bases de datos públicas.

Tabla 3: Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *MMAA*.

EXÓN	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5'→3'	T _m (°C)	PCR tamaño
1	1A-MMA	TAGGGAGGTCACAATCACATTGAGC	63	439
	1B-MMA	AACAGAATACAGAGAATTGTAAA	55	
2	2A-MMA	CTCAGTAAACTGATCGTAGTTCTG	60	450
	2B-MMA	GATCATCTTCAACTTCTGGCACCTG	63	
3	3A-MMA	GGAAGTGGCTGATAATTGACCCGTA	63	507
	3B-MMA	CCTAATGTTTACAGTTCTCCTCTGGC	63	
4	4A-MMA	GGTTGACTGTGTGACCATGAGTATG	63	470
	4B-MMA	GCTGGAGCGATCCATGTATTTCACT	63	
5	5A-MMA	GCCAATGCTTTTGAGTAATTTCTGTCA	60	472
	5B-MMA	TCATGACTACACACTCCGTCCTTGTC	63	
6	6A-MMA	TAAGAATTAAGTGGCAGGTATCAGC	59	527
	6B-MMA	CTAACTCCTTCAAGTTTCAAGCATG	60	

Estos oligonucleótidos fueron diseñados utilizando la secuencia del contig NT_016354 depositada en las bases de datos públicas.

Tabla 4: Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *MMAB*.

EXÓN	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5'→3'	T _m (°C)	PCR tamaño
1	5'MMAB	GCACGAGGGTCAAGCAGCCTG	66	134
	1B-MMAB	CACGATTCACGGCAGGTGTT	59	
2	2A-MMB	ATCCCCACTCACCAGATACTGAT	60	163
	2B-MMB	GAACITTTAAAATGGTGTATGCCATGAG	60	
3	3A-MMB	GCCTGGATGACAGAGTGACTGTT	62	338
	3B-MMB	ATAAGGGCTGACAACCTCCGAGG	64	
4	4A-MMB	GACTGGAAATAATGAGCATCCGA	59	357
	4B-MMB	TAACTGGTGGCTGGATGCTGAGT	62	
5	5A-MMAB	TCCAGCCCATCTCACATAGATC	60	114
	5B-MMAB	GATCCCAGATGGTGACCCTA	59	
7	7A-MMBnew	GGCTGGACTTCAGAGGAGCT	61	289
	7B-MMBnew	TCAGAGATGGCCCTGCTGTA	59	
8	8A-MMAB	TGTTGAGCCCCATAATGTCAC	58	103
	8B-MMAB	AGATGAGCCTCGGCTTTCAG	59	
9	9A-MMAB	ATATGGGAAGACCCAGTTAGC	58	109
	3'MAB	ATGGAGGGATCCTCCAAGCT	62	

Estos oligonucleótidos fueron diseñados utilizando la secuencia del contig NW_009775 depositada en las bases de datos públicas.

Tabla 4: Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del pseudoexón del gen *MUT*.

NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5'→3'	T _m
MUT10-11A	GCTATCAAGAGGGTTCATAAATT	54
MUT11ins76	TCTTTCCAGAGTCTCGCTCTTT	59
MUT6B	GTTCTTTGATGAGTTCAG	56
26141B	TGGCACGTGCCTGTAGTACC	58
28384A	GGCTTCCAGCTTCATCCATG	58
Ex 13 B	AGCATGACACCAGGCCTATAA	63

Estos oligonucleótidos fueron diseñados utilizando la secuencia del contig XM_035438 depositada en las bases de datos públicas.

3.2.3 Cultivo celular.

Los fibroblastos de piel de las líneas celulares diferentes que se utilizaron para este trabajo fueron cultivados en MEM suplementado con 10% de suero fetal de ternera (FCS), 2 mM de glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina; los amniocitos se cultivaron en RPMI con 2% Ultrosor, 10% FCS, 2 mM glutamina y antibióticos. Las líneas celulares fueron testadas de forma rutinaria para detectar contaminación por micoplasmas. Los estudios sobre splicing con minigenes se realizaron en las líneas celulares establecidas Hep3B, COS7, HeLa y HEK293, crecidas de la misma manera.

3.2.4 Cuantificación de mRNA mediante qRT-PCR.

El mRNA total se extrajo utilizando el reactivo TriPure de Ambion y la conversión del mRNA total a cDNA se realizó con el Archive kit (Applied Biosystems) o SuperScript III de Invitrogen.

Se utilizó la sonda TaqMan número Hs00604098 para cuantificar el cDNA *MUT*, para analizar el cDNA *MMAB* se utilizó el kit Lightcycler FastStart DNA Master SybrGreen I en un aparato LightCycler. Para estudiar el efecto de la mutación c.291-1G>A identificada en el gen *MMAB* se ha usado un oligonucleótido complementario a la unión de exones 3 y 4 generada por el skipping del exón (5'TTCAGCTATTGGGTTTGCTCTGG3' y 5'ATGGAGGGATCCTCCAAGCT 3'). El cDNA *MMAA* fue analizado utilizando un ensayo específico para PCR a tiempo real diseñado utilizando el software ProbeFinder de Roche Applied Science (Universal Probe Library). El RNA fue analizado mediante PCR a tiempo real en un aparato ABI Prism 7900HT de Applied Biosystems. En todos los casos los datos fueron analizados utilizando el software SDS suministrado por Applied Biosystems. Este software calcula los valores del ciclo umbral (Ct) para cada muestra y un control interno (Gliceraldehido Fosfato Deshidrogenasa, GAPDH) utilizando diferentes formulas aritméticas. Los oligonucleótidos utilizados para cuantificar el cDNA de *MMAA* son 5'CTTCGGGCGGGGAGGTCACAATCACA3' y 5'CAATCCTACTCGAAATGCTAG3' (Universal Probe nº63).

3.2.5 Construcción de minigenes y análisis in vitro de splicing.

La construcción de los distintos minigenes se realizó en el vector de *splicing* pSPL3 (*Exon Trapping System*, Life Technologies; cedido por el Dr. B. S. Andresen; (Buckler, et al., 1991).

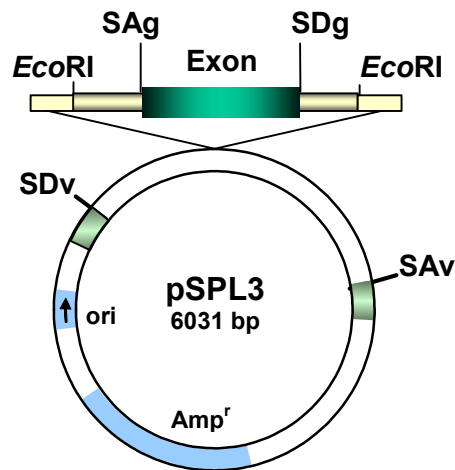


Figura 6. Esquema del vector de expresión pSPL3. SDv: Sitio donador de *splicing* del vector. SAV: Sitio aceptor de *splicing* del vector. Amp^r: Gen de resistencia a ampicilina. SDg: Sitio donador de *splicing* del exón introducido. SAg: Sitio aceptor de *splicing* del exón introducido.

Los fragmentos génicos correspondientes a los exones 6 y 7 del gen *MMAB* junto con sus regiones intrónicas adyacentes, y los fragmentos correspondientes al pseudoexón del gen *MUT* normal y con las mutaciones correspondientes se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico de controles y de los pacientes portadores de los cambios nucleotídicos a estudiar.

Los fragmentos resultantes de la amplificación fueron clonados en el vector *pCR®II-TOPO®* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. El fragmento introducido en cada caso fue escindido del vector *pCR®II-TOPO®* con los enzimas de restricción *EcoRI* y *Not I* y clonado en el vector plasmídico pSPL3 digerido previamente con estos mismos enzimas.

Las diferentes construcciones normales y mutantes en la orientación correcta fueron seleccionadas por análisis de restricción y secuenciación cíclica directa.

Se transfectaron en células utilizando el reactivo Jet PEI (Polyplus TransfectionTM). Se cultivan las células como se ha descrito anteriormente y se transfectan añadiendo 6 µL por pocillo en una solución de 200 mL de NaCl 0,5mM al medio de cultivo. Las células se recogen por tripsinización y se extrae el RNA total utilizando TriPure Isolation Reagent de Invitrogen. La RT-PCR se lleva a cabo con 1 µg de RNA total y utilizando los *primers* SA2 (5'ATCTCAGTGGTATTGTGAGC3') y SD6 (5'TCTGAGTCACCTTGACAACC3') que hibridan con zonas del vector pSPL3.

3.2.6 Transfección de oligonucleótidos antisentido tipo morfolinos y Vivo-Morfolinos en fibroblastos.

Los oligonucleótidos antisentido tipo morfolino (AMO) fueron diseñados, sintetizados y purificados por Gene Tools (Philomath, OR) y fueron diseñados contra los sitios crípticos aceptores y donadores en el pre-mRNA de la secuencia intrónica insertada siguiendo los criterios del fabricante (Morcos, 2007). La secuencia de los AMOs utilizados fueron AAGAGCGAGACTCTGTTTCAAAAAA (AMO A) y TGAGGCAGAAGACTCACTTGAACCC (AMO B).

Como método de transfección se utilizó Endo-Porter (Gene-Tools). Para el tratamiento con AMO se crecieron $4-5 \times 10^5$ células en placas de 6 pocillos y se trataron con diferentes concentraciones de AMO con 6 μ L/mL de Endo-Porter. Las células se recogieron a diferentes tiempos y se aisló el mRNA como se ha descrito anteriormente.

En los estudios con Vivo-Morfolinos, estos fueron diseñados, sintetizados y purificados por Gene Tools (Philomath, OR) y fueron diseñados de igual manera que los AMO. La secuencia utilizada fue TGAGGCAGAAGACTCACTTGAACCC (VIVO B). Al ser una molécula conjugada con un dendrímero no necesita de agente de transfección. Para el tratamiento con Vivo-Morfolinos se crecieron $4-5 \times 10^5$ células en placas de 6 pocillos y se trataron con diferentes concentraciones de Vivo-Morfolino.

Para realizar la RT-PCR en la línea celular del paciente 11064, se utilizó un oligonucleótido situado en la unión de los exones 10 y 11 (5'GCTATCAAGAGGGTTCATAAATT3') y un oligonucleótido reverso localizado en el exón 13 (5'CTTAGAAGAAGAGATTTT3') para amplificar sólo el alelo correspondiente a la inserción del pseudoexón entre los exones 11 y 12. En algunos casos se utilizó un primer situado en la unión del exón 11 y la secuencia insertada (5'TCTTTTCCAGAGTCTCGCTCTTT3') para amplificar selectivamente el cDNA con la inserción intrónica. En el caso de las demás líneas celulares de pacientes se utilizó el primer directo 26141 (5'TGGCACGTGCCTGTAGTACC3') y otro reverso localizado en el exón 13 (5'AGCATGACACCAGGCCTATAA3').

3.2.7 Análisis por microarray.

Se utilizó un Microarray del Genoma Humano Completo 4x44K (G4112F, Agilent Technologies) para analizar los perfiles de expresión génica en fibroblastos del paciente 11064 (Rincon, et al., 2007) cultivados durante 24h en presencia o ausencia de AMO. El RNA total se extrajo utilizando el reactivo Trizol (Roche). La integridad y la concentración del RNA total se determinó corriendo la muestra en geles de agarosa 1.5% y posterior medida en el Nanodrop (Agilent, espectrofotómetro ND-1000) y la calidad se analizó en un Bioanalizador Agilent 2100 Bioanalyzer.

El análisis de microarrays se realizó en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Investigación Cardiovascular (CNIC). Se utilizó un protocolo de análisis de expresión génica tipo *One-Color Microarray- Based Gene Expression Analysis Protocol* (Agilent Technologies) para amplificar y marcar el RNA. Básicamente, se realizó la transcripción reversa de 1 µg de RNA total utilizando un primer del promotor de T7 y MMLV-RT. El cDNA se convirtió a aRNA utilizando la T7 RNA polimerasa, que simultáneamente amplifica el material diana e incorpora CTP marcado con cianina (Cy3). 1,65 µg de aRNA marcado con Cy3 se fragmentó y se hibridó durante 17 horas a 65°C en un horno de hibridación (G2545A, Agilent) a una concentración final de 10 rpm en 1x Gex Hybridization Buffer HI-RPM, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, Agilent). Los arrays se lavaron según las instrucciones del fabricante y se secaron usando una centrifuga. Se escasearon a una resolución de 5µm de resolución en un aparato Agilent DNA Microarray Scanner (G2565BA, Agilent) utilizando las condiciones por defecto para los arrays 4x44K. Las imágenes se analizaron utilizando el software Feature Extraction v.9.5.3.1 de Agilent.

3.2 10 Medida del stress celular.

Los fibroblastos de piel del paciente 11064 se cultivaron como se describe en (Richard, et al., 1999). Las células se crecieron con y sin Endo-Porter o Vivo-Morfolino como se describe más arriba. Se analizaron 48 horas después de la transfección o a los 7 días después de la transfección. En este caso (7 días después) las células fueron transfectadas de nuevo cada 48h. El nivel de ROS (H₂O₂) se determinó utilizando la sonda H₂DCFDA (2', 7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) (LeBel, et al., 1992) mediante citometría de flujo en un aparato FACSCalibur (Becton Dickinson). Las células se recogieron mediante tripsinización y la intensidad de fluorescencia se midió después de 30 minutos de incubación a 37°C en oscuridad con 0,4 µM de H₂DCFDA.

3.2.8 Soporte informático.

Las secuencias de los cDNAs y DNA genómico de los genes MUT, MMAA y MMAB así como la de las proteínas correspondientes fueron obtenidas mediante búsquedas bioinformáticas en las bases de datos públicas *GenBank* de NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/>) y de la base de datos *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>) y *PDB (Protein Data Bank)* de SWISS-PROT (<http://www.expasy.org/sprot/>).

La búsqueda de dianas de restricción en los genes *MUT*, *MMAA* y *MMAB* y en sus correspondientes cDNAs se realizó con los programas Webcutter 2.0 de Firstmarket (<http://www.ccsi.com/firstmarket/cutter/>).

El procesamiento y análisis de secuencias de DNA se llevó a cabo con los programas Chromas 1.45 (Griffith University, Australia) y Chromas 2.22 (Technelysium).

Para la búsqueda de secuencias homólogas en las bases de datos públicas se utilizaron programas de BLAST en el servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

El tratamiento de imágenes digitales se realizó mediante los programas Kodak Digital Science 1D 2.0.3. (Kodak Scientific Image Systems).

El análisis estructural de las mutaciones *MMAB* y la localización de los aminoácidos mutados en la proteína ATR se realizó a partir del modelado por homología de secuencia con la proteína homóloga de *T. acidophilum* código de acceso 1NOG disponible en el banco de datos PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>). La visualización de las estructuras tridimensionales y la localización de los aminoácidos mutados en las distintas variantes alélicas de *MMAB* se realizaron con el soporte informático DS ViewerPro5.0 de Accelrys Inc.

La identificación de los posibles sitios aceptores y donadores de *splicing* en una determinada secuencia se realizó con el programa informático *Splice Site Prediction* de BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS GENÉTICO EN PACIENTES CON ACIDURIA METILMALÓNICA AISLADA Y HOMOCISTINURIA.

Todos los pacientes fueron diagnosticados bioquímicamente de aciduria metilmalónica aislada o con homocistinuria en base a sus niveles de metabolitos marcadores en sangre y orina.

La asignación de los pacientes con MMAuria dentro de los distintos grupos de complementación *mut*, *cbIA*, *cbIB* y *cbID* se llevó a cabo mediante diversas determinaciones realizadas en el laboratorio. En aquellos casos en los que se dispuso de líneas celulares de los pacientes se realizaron estudios de complementación genética. Asimismo se llevaron a cabo diferentes ensayos enzimáticos previos a la secuenciación de los genes correspondientes, como son la medida de la actividad de la enzima metilmalonil-CoA mutasa y la incorporación de [1-¹⁴C] propionato a proteína en fibroblastos cultivados en medio basal o suplementado con hidroxycobalamina (OhCbl) (Perez-Cerda, et al., 1989).

Con el fin de identificar y analizar las mutaciones y los genotipos causantes de aciduria metilmalónica en los pacientes diagnosticados dentro de los grupos de complementación *mut*, *cbIA* y *cbIB* se procedió a realizar el estudio molecular de los genes correspondientes *MUT*, *MMAA* y *MMAB* tanto a nivel de RNA como de DNA genómico. Para ello, previamente a la caracterización de las mutaciones fue necesario proveer un contexto genómico y conocer la organización estructural de los genes a analizar lo que permitió diseñar los oligonucleótidos correspondientes basados en las secuencias disponibles en las bases de datos públicas del NCBI y del Ensembl.

El análisis genético incluye un total de 22 pacientes pertenecientes a 21 familias, 10 pacientes pertenecientes al grupo de complementación *cbIA*, 6 pacientes pertenecientes al grupo *cbIB*, 5 pacientes con defectos en el gen *MUT* y un paciente perteneciente al grupo de complementación *cbIE*. El laboratorio dispone de líneas de fibroblastos en cultivo de todos los pacientes estudiados a partir de los cuales se obtuvo el material genético, DNA genómico y mRNA para el análisis. Así mismo, cuando el material genético de los padres se encontró disponible, se realizó el análisis familiar para confirmar la presencia de las mutaciones en homocigosis y en los pacientes con mutaciones en heterocigosis, para confirmar si estas están en posición *cis* o *trans*. Otras líneas celulares no deficientes en los genes *MUT*, *MMAA* y *MMAB* se utilizaron como control.

4.1.1 Análisis de mutaciones en el gen *MMAA*.

El gen *MMAA* fue analizado en pacientes pertenecientes al grupo de complementación *cbIA*. Las líneas celulares de estos pacientes presentan la actividad MCM medida con adenosilcobalamina normal y en el 90% de los casos presentan estimulación positiva de [1-¹⁴C] propionato a proteínas en presencia de OH-Cbl.

Se ha llevado a cabo el análisis genético de 10 individuos *cblA* mediante secuenciación del cDNA y gDNA de este gen. En este caso, se ha podido determinar los genotipos causantes de enfermedad identificando 8 variantes alélicas distintas en el gen *MMAA*. Todas ellas son mutaciones que supuestamente producen proteínas truncadas.

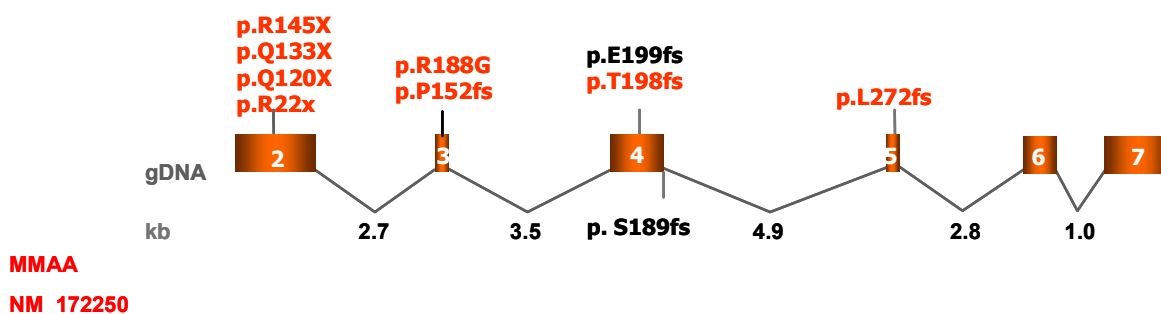


Figura 7: Representación esquemática de la estructura genómica del gen *MMAA*. La figura muestra todas las variantes alélicas identificadas en los pacientes *MMAA* analizados en este trabajo y su localización en los diferentes exones. La representación de la estructura del gen se realizó basada en la información pública del contig genómico disponible en las bases de datos (NT_016354). Se muestran en rojo las mutaciones descritas en este trabajo.

Tabla 5: Genotipo, fenotipo clínico y respuesta bioquímica a B₁₂ de los pacientes pertenecientes al grupo de complementación *cblA* analizados.

Línea Celular (origen)	GENOTIPO <i>MMAA</i>		FENOTIPO		
	Alelo 1	Alelo 2	Presentación	Respuesta <i>in vivo</i> a B ₁₂	Evolución
6063 (España)	p.R145X (c.433C>T)	p.R145X (c.433C>T)	Infantil	+	Perdido seguimiento desde los 16a
8218 (España)	p.R145X (c.433C>T)	p.R145X (c.433C>T)	Infantil	?	Vivo, 23a
10083 (España)	p.Q133X (c.397C>T)	p.Q133X (c.397C>T)	Infantil	-	Vivo, 19a. Suave retraso psicomotor
13014 (Chile)	p.Q120X (c.358C>T)	p.L272fs (c.812-813dupAG)	Infantil	+	Vivo, 15a. Ligera hipotonía, problemas de atención
16929 (Ecuador)	p.R145X (c.433C>T)	p.R145X (c.433C>T)	Infantil	-	Vivo, 6a. Retraso psicomotor y físico
20245 (España)	p.R22X (c.64C>T)	p.R145X (c.433C>T)	Infantil	+	Vivo, 26a. Desarrollo psicomotor normal
21238 (Hungría)	p.T198fs (c.592-595del4)	p.T198fs (c.592-595del4)	Infantil	+	Vivo..Normalización de alteraciones hematológicas con B ₁₂
21431 (Chile)	p.R188G (c.562G>C)	p.R188G (c.562G>C)	Infantil	-	Vivo, 10a. Retraso psicomotor
22265 (Italia)	p.R145X (c.433C>T)	p.R145X (c.433C>T)	Infantil	+	Vivo, evolución espectacular
22751 (Turquía)	p.P152fs (c.456delT)	p.P152fs (c.456delT)	Infantil	?	Vivo, retraso psicomotor.

+ Respuesta bioquímica positiva a OHCbl intramuscular. - Respuesta bioquímica negativa. ? No hay información disponible.

El espectro mutacional del gen *MMAA* incluye 3 pequeñas duplicaciones (p.P151fs, p.L272fs y p.E199fs) que previsiblemente producen parada prematura de la

traducción fuera de fase, 4 mutaciones de cambio de nucleótido que generan codones stop (p.R22X, p.Q120X, p.Q133X y p.R145X) y una mutación de posible cambio de aminoácido (p.R188G) como se discutirá más adelante. Todas las mutaciones identificadas se encuentran en los cuatro primeros exones del gen *MMAA*.

Cuatro de los pacientes *cblA* presentaron en homocigosis la mutación *nonsense* c.433C>T (p.R145X) siendo así la más frecuente en esta serie de pacientes. Así mismo esta mutación se ha encontrado en otro paciente en heterocigosis, junto a la mutación c.64C>T (p.R22X). En otro de los pacientes analizados se encontró en homocigosis la mutación *nonsense* c.397C>T (p.Q133X). Y en un paciente de origen chileno se encontró en heterocigosis la mutación *nonsense* c.358C>T (p.Q120X) junto con una pequeña duplicación en el otro alelo, c.812-813 dupAG (p.L272fs)

Se ha encontrado una alta frecuencia de pacientes homocigotos (80%). En todos los casos la presentación de la enfermedad es infantil y la evolución clínica es buena, todos están vivos y tienen actualmente entre 6 y 26 años. Todos ellos, con excepción del paciente 21431, responden bioquímicamente a la suplementación de OHCbl disminuyendo los niveles de ácido metilmalónico en sangre.

4.1.2 Análisis de mutaciones en el gen *MMAB*.

Inicialmente el estudio molecular del gen *MMAB* se llevó a cabo a nivel de mRNA mediante retrotranscripción y posterior amplificación por PCR a partir de RNA total. Para ello fue necesario el diseño de 4 oligonucleótidos que hibridasen a lo largo del cDNA del gen *MMAB* permitiendo su amplificación en dos fragmentos solapantes. Así mismo fue posible amplificar la secuencia codificante completa con oligonucleótidos que hibridan en los extremos 3' y 5' del cDNA.

Una vez fueron detectados los cambios en el cDNA de los pacientes estudiados, el análisis molecular del gen a nivel de DNA genómico permitió identificar y confirmar la presencia de los cambios nucleotídicos en los exones correspondientes, así como determinar el carácter homocigoto o heterocigoto del paciente para dicha mutación.

Las secuencias que permitieron el diseño de oligonucleótidos utilizados en los procesos de transcripción reversa y amplificación fueron obtenidas mediante búsquedas bioinformáticas en las bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). De esta manera se localizó la secuencia codificante completa del gen *MMAB*. Una vez detectada se utilizaron programas de alineamiento (BLAST) para localizar el contig genómico que contiene la secuencia del gen *MMAB*, empleando como sondas las secuencias de cada exón. De esta manera se obtuvieron las secuencias correspondientes al cDNA, los exones y el contig genómico para el gen *MMAB* (para los genes *MUT* y *MMAA* ya se había realizado con anterioridad)

El espectro mutacional del gen *MMAB* (NM_052045) incluye 7 cambios de un único nucleótido, dos de ellas en la región intrónica (c.291-1G>A y c.349-1G>C) y cuatro localizadas en la zona codificante.

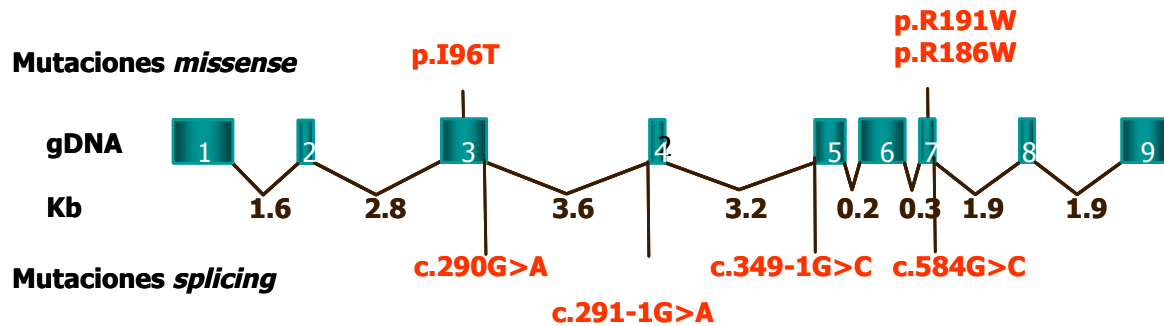


Figura 8: Representación esquemática de la estructura genómica del gen *MMAB* y las mutaciones identificadas en este estudio. La figura muestra todas las variantes alélicas identificadas en los pacientes *MMAB* analizados en este trabajo (en rojo) y su localización en los diferentes exones. La representación de la estructura del gen se realizó basada en la información pública del contig genómico disponible en las bases de datos (NW_009775).

Tabla 6: Genotipo y fenotipo clínico de los pacientes pertenecientes al grupo de complementación *cbIB*.

Línea (origen)	GENOTIPO		FENOTIPO CLÍNICO	
	Alelo 1	Alelo 2	Comienzo de los síntomas	Evolución
PACIENTES QUE RESPONDEN <i>IN VITRO</i> A B ₁₂				
17547 (España)	p.I96T (c.287T>C)	p.R191W (c.571C>T)	Neonatal	2a, encefalopatía severa
19235 (España)	p.I96T (c.287T>C)	p.S174fs (c.584G>A)	Infantil, 4a.	Falleció a los 4a.
19244 (España)	p.I96T (c.287T>C)	p.S174fs (c.584G>A)	Clínicamente normal	2a, estudiado debido a una hermana afectada
PACIENTES QUE NO RESPONDEN <i>IN VITRO</i> A B ₁₂				
19777 (UK)	p.R186W (c.556C>T)	p.R186W (c.556C>T)	Neonatal	Falleció a los 10d.
13469 (España)	p.G97fs (c.291-1G>A)	p.G97fs (c.291-1G>A)	Neonatal	Hermana falleció a los 48d.
24080 (España)	p.G66fs (c.290G>A)	IVS4-1G>C (c.349-1G>C)	Neonatal	Asintomático

Los seis pacientes *cbIB* estudiados en este trabajo se han clasificado en dos grupos en función de la estimulación de la incorporación de ¹⁴C-propionato *in vitro* o respuesta *in vitro* a B₁₂. Así se han identificado 3 líneas celulares que responden a B₁₂ y otras tres que no.

Los cambios nucleotídicos localizados en la zona codificante son todos, excepto dos, de posible cambio de aminoácido c.287T>C (p.I96T), c.571C>T (p.R191W), c.556C>T (p.R186W). Los cambios c.584G>A y c.290G>A afectan al último nucleótido del exón 7 y 3, respectivamente, que afecta al correcto procesamiento del mRNA y produce una delección del exón 7 y del exon 3, provocando las mutaciones PTC p.S174fs y p.G66fs, respectivamente.

En 2 de los pacientes (19777 y 13469) se han encontrado las mutaciones en homocigosis, c.556C>T (p. R186W) y el cambio en región intrónica c.291-1G>A. Esta variación en la secuencia intrónica c.291-1G>A afecta al sitio aceptor de *splicing* del intrón 4 generando una delección del exón 4 que produce un cambio en la pauta de lectura (p.G97fs).

Hemos encontrado la variante alélica c.287C>T (p.I96T) en heterocigosis en los tres pacientes restantes, en uno de los casos acompañada del cambio c.571C>T (p.R191W).

Los pacientes 13469 y 19777 con las mutaciones p.G97fs y p.R186W en homocigosis respectivamente, no mostraron estimulación en la incorporación de propionato con hidroxicobalamina (OHCbl). Sin embargo, el paciente 17547 portando las mutaciones p.I96T y p.R191W y los pacientes 19235 y 19244, portando las mutaciones p.I96T y c.584G>A, si presentaron estimulación *in vitro* con OHCbl.

El perfil transcripcional y la subsiguiente secuenciación de los productos amplificados por PCR del paciente 24080 mostraron la presencia de dos bandas diferentes, una de ellas corresponde al *skipping* del exón 3 (r.197-291del) que genera una proteína truncada y la otra corresponde a una delección en fase de dos aminoácidos (r.349-354del6) debida a la activación d un sitio críptico de *splicing* dentro del exón 5. El análisis del gDNA mostró dos cambios nucleotídicos c.290G>A y c.349-1G>A en el último nucleótido del exón 3 y en el sitio 3' de *splicing* del intrón 4, respectivamente.

Todos los pacientes excepto dos (19244 y 19235) tuvieron una presentación neonatal, dos han fallecido y de los vivos, dos son asintomáticos (19244 y 24080) y el restante (17547) tiene una fuerte afectación neurológica. El paciente 19235 permaneció sano hasta una crisis fatal a los 4 años de edad. Su hermano, 19244, que comparte el genotipo fue diagnosticado cuando falleció su hermano y, permanece actualmente clínicamente sano aunque presenta niveles detectables de ácido metilmalónico en fluidos fisiológicos y niveles altos de OLCFA (*odd-Numbered Long-Chanin Fatty Acids*, ácidos grasos de cadena impar) en plasma.

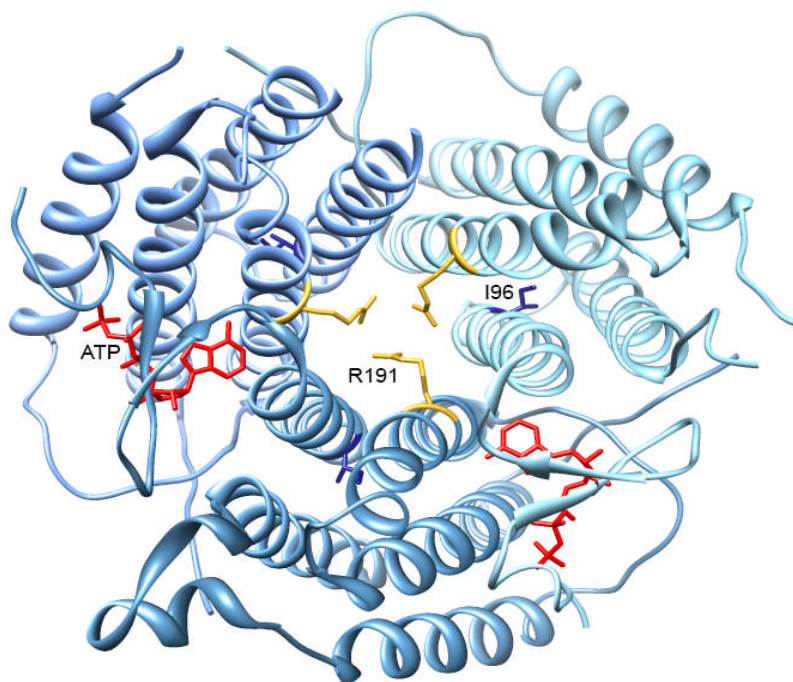


Figura 9: Estructura tridimensional de la proteína ATR. Visualización de la estructura cristalina de la ATR y localización del residuo I96 utilizando el programa DSViewerPro5.0 (Accelrys Inc.) y el archivo 2IDX del PDB.

El residuo R96 de la proteína ATR está localizado en la hélice $\alpha 1$, que es estructuralmente importante para la formación del sitio de unión para el ATP entre monómeros adyacentes, específicamente entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de un monómero y el loop $\alpha 3$ - $\alpha 4$ y las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ del monómero vecino (Schubert and Hill, 2006). Debido a la localización de este residuo en la hélice $\alpha 1$, su mutación puede cambiar la estabilidad de la proteína y/o perturbar el sitio de unión de los sustratos, el ATP y la cobalamina. El residuo R191 se proyecta hacia la cavidad dental de la estructura trimérica de la ATR e interacciones entre este residuo y los adyacentes en los otros monómeros pueden jugar un papel importante en la estabilización de la estructura cuaternaria de la proteína (Figura 9).

4.1.3 Análisis de mutaciones en el gen *MUT*.

Se han estudiado 5 pacientes MMA pertenecientes al grupo de complementación *mut*. El estudio del perfil transcripcional mediante RT-PCR permitió observar un *splicing* aberrante dando una banda extra de mayor tamaño. Mediante análisis de secuencia de productos obtenidos por RT-PCR y búsquedas por BLAST de alineamientos, se vio que el segmento correspondiente a la banda superior de mayor

tamaño contenía una secuencia intrónica de 76 nucleótidos entre los exones 11 y 12 (r.1956-1957ins76).

Para analizar e identificar la secuencia de este segmento se llevaron a cabo diferentes reacciones de PCR con oligonucleótidos sintéticos diseñados específicamente para hibridar con distintas regiones genómicas. La región comprendida en el segmento de 76 bases es estructuralmente la de un pseudoexón que presenta sitios de *splicing* 5' donador y 3' aceptor compatibles con las secuencias consenso, aunque el sitio aceptor de *splicing* 3' es pobre (0.98 y 0.72 respectivamente)

Tabla 7: Genotipo de los pacientes con MMA pertenecientes al grupo de complementación *mut*.

Paciente	Alelo 1	Alelo 2
11064	p.V583fs (c.1808G>A)	c.1957-891C>A (g.26784 C>A)
10599	p.N341fs (c.1022-1023dupA)	c.1957-898A>G (g.26797 A>G)
14969	[p.L617R+p.I69V] (c.1850T>G;c.205A>G)	c.1957-898A>G (g.26797 A>G)
25848	p.N219Y (c.655A>T)	[p.V153D; (c.1957-920C>A)] (c.458T>A; g.26775 C>A)
27547	p.C540X (c.1620T>A)	[p.R629G; c.1957-920C>A] (c.1885A>G; g.26775 C>A)

Para comprobar si esta inserción de 76 nucleótidos podía encontrarse en otros pacientes portadores de mutaciones PTC se desarrollaron análisis de RT-PCR en líneas celulares de fibroblastos *mut*⁰ y sujetos control. En todos los casos sólo detectamos el exón críptico cuando el análisis del cDNA se realizó empleando un oligonucleótido que hibrida entre el exón 11 y la secuencia insertada (MUT11ins76), sugiriendo que el segmento intrónico se encuentra presente de forma natural en mRNAs raramente transcritos en la célula.

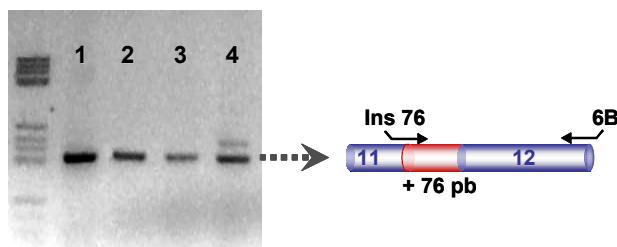


Figura 10: Análisis mediante RT-PCR de la secuencia insertada. Patrón de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos que hibridan entre el exón 11 y la secuencia insertada (oligo MUT11ins 76) y un oligo localizado en el exón 12 (6B). Los números indican los fragmentos de mRNA obtenidos de líneas de fibroblastos de pacientes *mut*⁰: 11064 (carril 1), 9773 (carril 2), 11423 (carril 3), y de una línea celular

control (carril 4). Representación esquemática parcial del cDNA *MUT*, en la que se pueden ver los oligos utilizados.

El análisis del DNA de los 5 pacientes que presentaron la inserción encontramos tres mutaciones intrónicas diferentes en el intrón 11 (Tabla 7) c.1957-891C>A (g.26784 C>A), c.1957-898A>G (g.26797 A>G), c.1957-920C>A (g.26775C>A).

En el paciente 11064 se identificó el cambio nucleotídico c.1957-891C>A que aumenta ligeramente el valor del sitio 5' de *splicing* del pseudoexón de 0.98 a 0.99. Estudios *in silico* adicionales no revelaron cambios significativos en las secuencias reguladoras de *splicing* causadas por la mutación (con los programas RescueESE y PESX no se encontró ningún ESE o ESS y el análisis mediante el programa ESE-Finder reveló una pequeña disminución en los valores para SC35, SRp40 y SRp55). Este cambio está fuera de la unión con U1.

Los pacientes 10599 y 14969 exhibieron un cambio de A por G en el intrón 11 en la posición -1 en relación al sitio 5' de *splicing* de la secuencia insertada, cambio que se detectó en heterocigosis. Uno de estos pacientes además lleva las mutaciones p.L617R e p.I69V en *cis* en el otro alelo, mientras que el otro paciente porta en posición *trans* la mutación p.N341fs. La mutación c.1957-898 A>G aumenta el score del sitio 5' de *splicing* a 0,99. Este cambio además, aumenta de 7 a 8 el número de nucleótidos que complementan con el RNA U1 que se une al sitio 5' donador de *splicing*. La snRNP U1 juega un papel crucial en el reconocimiento del sitio 5' durante el proceso de *splicing*.

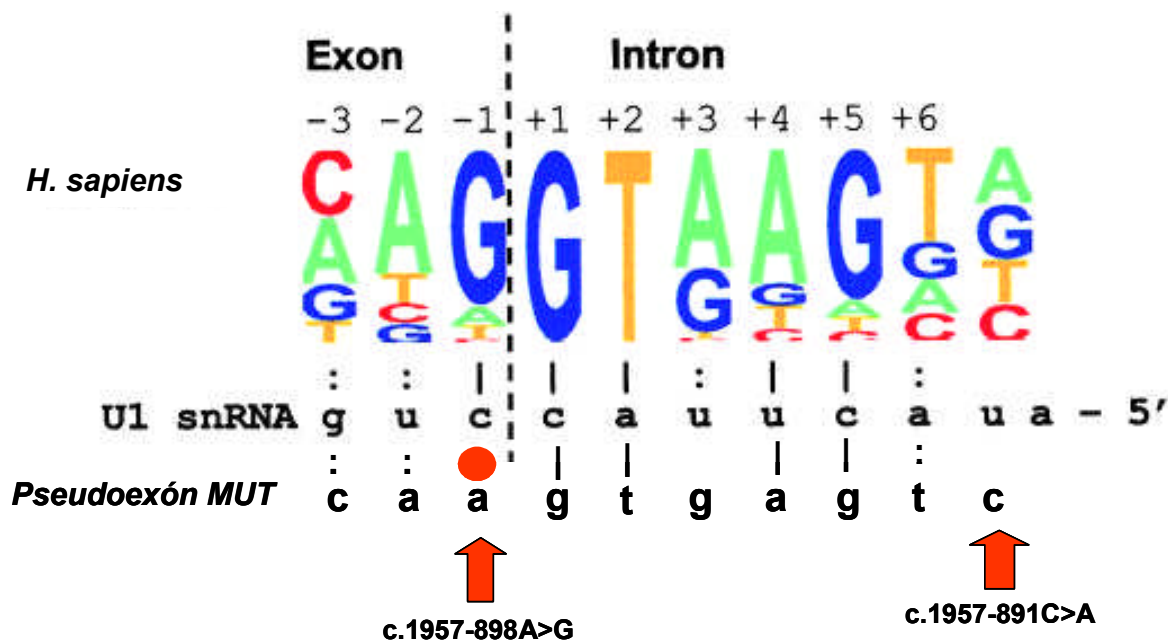


Figura 11: Motivo de unión entre la secuencia consenso 5' de *splicing* y la secuencia de reconocimiento del snRNA U1. La altura de cada letra indica la frecuencia de cada nucleótido en esa posición. En cada posición, los nucleótidos se muestran de arriba a abajo en orden decreciente de frecuencia. Se han marcado con flechas la posición de las mutaciones c.1957-898A>G y c.1957-891C>A descritas en este trabajo, debajo de la secuencia del sitio 3' de *splicing* del pseudoexón.

En otras dos líneas celulares de pacientes (25848 y 27547) hemos identificado un cambio en el medio de la secuencia insertada (c.1957-920C>A, g.26775 C>A) también en heterocigosis. El análisis *in silico* utilizando el software ESEfinder mostró que este cambio produce una disminución en el *score* para dos sitios de unión de la proteína SRp40, implicada en *splicing*. El análisis genético de uno de los dos pacientes identificó dos mutaciones *missense* en heterocigosis, un cambio nuevo p.V153D (c.458T>A) y un cambio previamente descrito p.N219Y (c.655A>T). En el otro paciente se han identificado dos cambios nuevos, p.C540X (c.1620T>A) y p.R629G (c.1885A>G). El estudio familiar reveló la presencia de los cambio p.V153D y p.R629G en posición *cis* con el cambio nucleotídico c.1957-920C>A, por lo cual sin estudios funcionales no podemos concluir cuál es la variante de secuencia que en estos pacientes es causante de enfermedad.

La variante intrónica identificada en estos pacientes no estaba presente en las bases de datos de SNP y no fue encontrada en 100 alelos control analizados mediante PCR a tiempo real y análisis por el software de detección de cambios de *High Resolution Melting*.

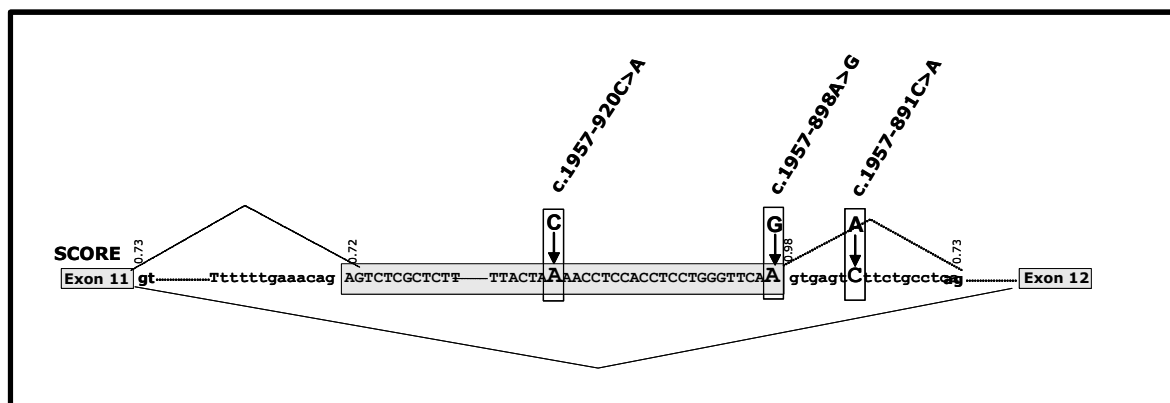


Figura 12: Representación esquemática de la estructura genómica del intrón 11 del gen *MUT* donde se encuentra el pseudoexón y los cambios nucleotídicos encontrados. La figura muestra todas las variantes intrónicas identificadas en los pacientes *MUT* analizados en este trabajo y su localización. La representación de la estructura del gen se realizó basada en la información pública del contig genómico disponible en las bases de datos (NT_007592)

Utilizando el software RepeatMasker encontramos que el pseudoexón identificado corresponde con una secuencia *Alu* (Figura 13).

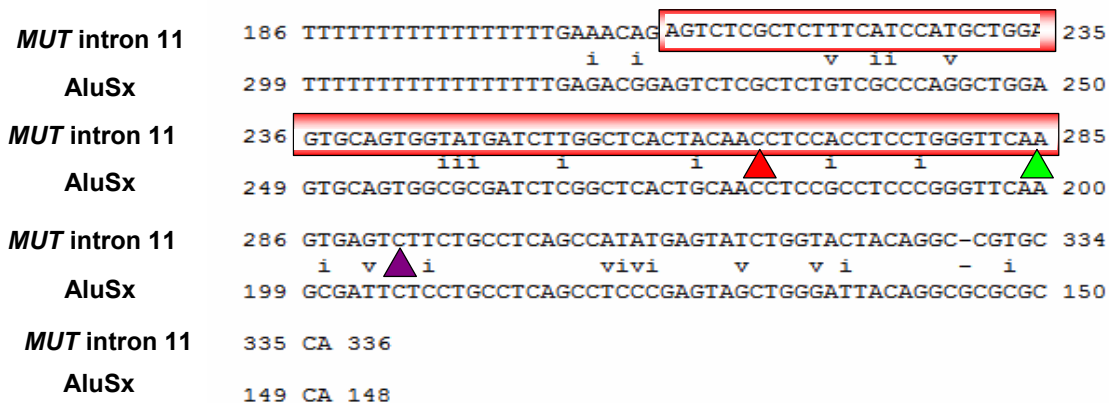


Figura 13: Alineamiento de la secuencia del pseudoexón y la secuencia Alu utilizando el programa RepeatMasker (www.repeatmasker.org), los nucleótidos que coinciden se muestran como transiciones (i) o transversiones (v). Las secuencias intrónicas corresponden al contig genómico NT_007592 del cromosoma 6. Los tres cambios nucleotídicos encontrados en la secuencia del pseudoexón se muestran con triángulos, rojo para la mutación c.1957-920C>A; verde para c.1957-898A>G y morado para el cambio c.1957-890C>A.

4.1.4 Análisis de mutaciones en el gen *MTRR*.

El gen *MTRR*, deficiente en pacientes *cblE* (NM_002454) fue analizado en un único paciente perteneciente a este grupo de complementación. Se ha llevado a cabo el análisis genético mediante RT-PCR observándose un único cambio c.166G>A (p.V56M) en homocigosis en el cDNA y en el gDNA (Figura 14). El estudio en el DNA genómico reveló que esta mutación sólo estaba presente en la muestra del padre.

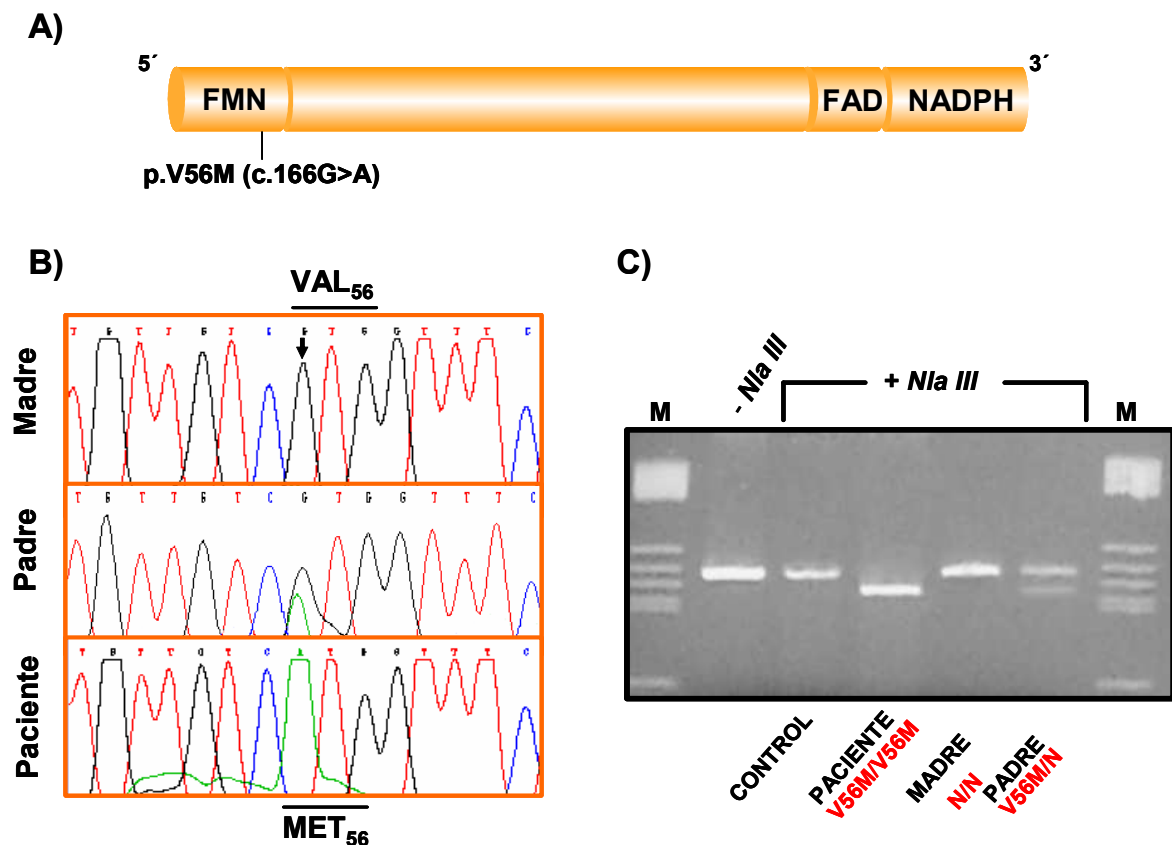


Figura 14: Estudios realizados en el paciente perteneciente al grupo de complementación *cbIE*. **A)** Representación esquemática de los distintos dominios del gen *MTRR* y localización de la mutación p.V56M. **B)** Análisis mediante secuenciación del fragmento genómico donde se encuentra la mutación en el paciente y sus padres. **C)** Análisis de restricción de la región genómica donde se encuentra la mutación en el paciente el padre y la madre. El cambio nucleotídico c.166G>A genera una diana para el enzima *Nla*III.

4.2 ESTUDIOS FUNCIONALES DE MUTACIONES IDENTIFICADAS EN PACIENTES CON ACIDURIA METILMALÓNICA AISLADA.

4.2.1 Análisis del efecto de las mutaciones en la estabilidad del mRNA.

Para el análisis de los niveles de mRNA de pacientes pertenecientes al grupo de complementación *mut* y de pacientes pertenecientes al grupo de complementación *cbIA*, se analizó el mRNA extraído del cultivo de fibroblastos de 16 y 8 pacientes, respectivamente siempre con una línea celular control cultivada en paralelo. Una vez obtenido el RNA total, se utilizó 1µg del mismo para cuantificar los niveles de mRNA mediante qRT-PCR utilizando sondas TaqMan específicas para el cDNA del gen *MUT* y Sybr Green y sondas específicas Universal Probe en el caso del mRNA *MMAA*.

Con respecto a los pacientes pertenecientes al grupo de complementación *mut* los resultados indican que los niveles de mRNA están fuertemente reducidos en los

pacientes 10412, 16074 y 5590, todos ellos portando en los dos alelos mutaciones de codones de parada prematuros (PTC) (p.V227fs, p.R228X, p.K583fs, p.V583fs). Estas líneas tienen una disminución en los niveles de mRNA de entre 72 y 175 veces. Los pacientes 14969, 10599, 9773, 12940 y 11064, hemicigotos para una mutación *missense* y otra de *frameshift* o una delección en fase mostraron una bajada moderada de los niveles de mRNA (de 3 a 11 veces menor). Finalmente los pacientes 20786, 20570, 20196, 20070, 16009, 11423 y 14100 portando en ambos alelos mutaciones *missense* *mut*⁰ (p.L328P, p.A191E, p.L358P, p.G203R y p.Q109R) o mutaciones *mut* (p.R694W, p.Y231N y p.A324T), presentaron niveles normales de mRNA *MUT*.

Líneas Celulares

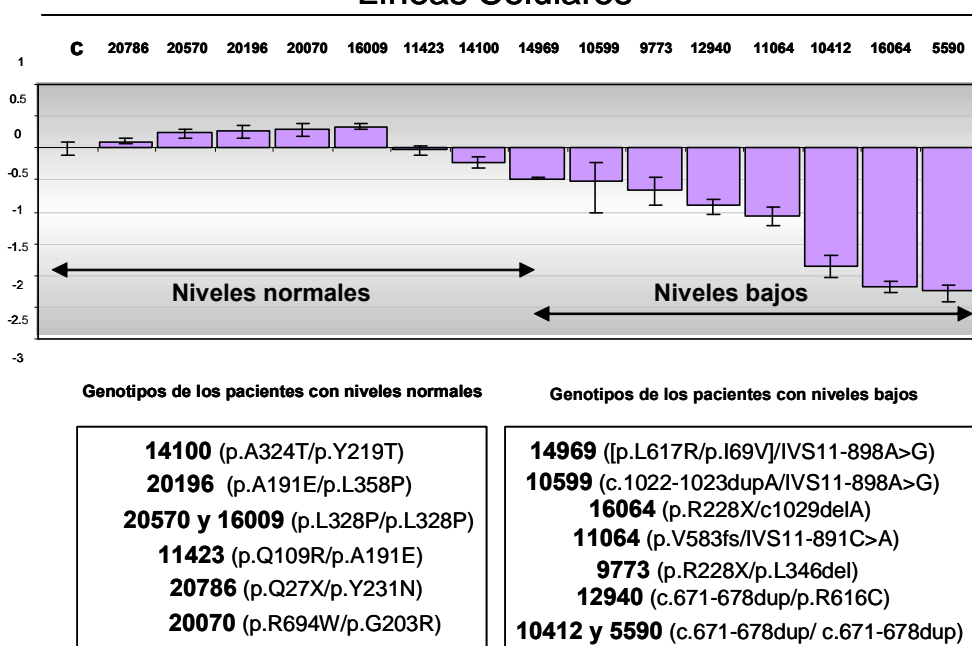


Figura 15: Análisis de la expresión génica del gen MUT en pacientes pertenecientes al grupo de complementación *mut*. El eje X representa las líneas celulares analizadas y el eje Y representa el resultado de los cálculos de cuantificación relativa en escala logarítmica (logRQ). $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. $\Delta\Delta Ct$ es calculado como la diferencia entre el ΔCt de la muestra y el ΔCt de un control interno, siendo en este caso el gen GAPDH de expresión constitutiva. Las cantidades se muestran como relativas al nivel de expresión del mRNA *MUT* de una muestra control en la que cada incremento corresponde a una diferencia en 10 veces en la expresión del gen. Los datos mostrados son la media de tres o cuatro replicas experimentales y las barras de error han sido calculadas como el máximo (RQ_{max}) y mínimo (RQ_{min}) del nivel de expresión lo cual representa el error estándar del valor medio de expresión (RQ). Los datos son la media de tres o cuatro replicas experimentales diferentes.

En el caso de los pacientes pertenecientes al grupo de complementación *cblA* los resultados indican niveles de mRNA normales o cercanos a la normalidad en todas las líneas celulares analizadas. Sólo los pacientes 13015 y 8218 mostraron una pequeña reducción en los niveles de mRNA *MMAA*.

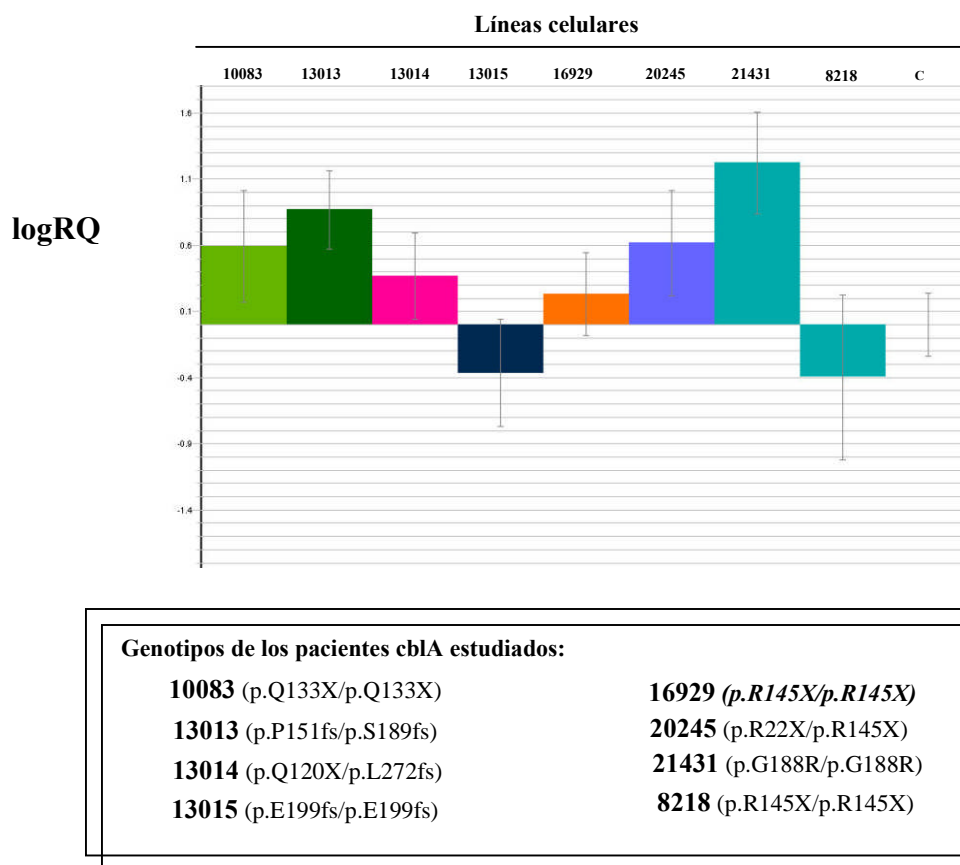


Figura 16: Niveles de mRNA del gen *MMAA* en pacientes *cblA*. El análisis de la expresión del gen *MMAA* se realizó utilizando una sonda específica y los resultados se representan como se ha descrito para el ensayo de expresión génica del gen *MUT*. La cuantificación del mRNA *MMAA* se realizó de una línea control y de los pacientes que se muestran en la figura. Los datos son la media de tres o cuatro replicas experimentales diferentes.

4.2.2 Estudios funcionales de mutaciones localizadas en secuencias conservadas de *splicing*.

Una fracción significativa de mutaciones causantes de EMH afectan al proceso de *splicing*. En este trabajo hemos identificado tanto variantes de secuencia en los sitios canónicos de *splicing* 3' y 5', como en regiones reguladoras intrónicas (Cartegni, et al., 2002). Las mutaciones que se han analizado en este trabajo localizadas en los sitios 3' y 5' están descritas en la Tabla 8.

Tabla 8: Mutaciones que afectan al correcto procesamiento del mRNA.

Mutación	Localización	Gen	Unión con snRNA U1	Score N->M*
c.291-1G>A	3' aceptor de splicing	MMAB	-	0,99 -> 0
c.584G>A	5' donador de splicing	MMAB	C A <u>g</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>g</u>	0,99 -> 0,6
c.562G>C	5' donador de splicing	MMAA	<u>A</u> C <u>g</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>u</u>	1 -> 0,98

Se muestran subrayados los nucleótidos que complementan con la secuencia consenso del snRNA U1 (secuencia consenso: AGguragu) * www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

4.2.2.1 Estudio de la mutación c.291-1G>A (paciente 13469)

Los resultados de los estudios del perfil transcripcional del paciente 13496, portador de la mutación **c.291-1G>A** indicaron la existencia de una banda correspondiente al *skipping* del exón 4.

Para investigar si se produce *splicing* normal asociado al cambio nucleotídico **c.291-1G>A**, encontrado en el gen *MMAB*, (la variación en la secuencia intrónica c.291-1G>A afecta al sitio aceptor de *splicing* del intrón 4 generando una delección del exón 4 que produce un cambio en la pauta de lectura (G97fs), se realizaron análisis de curvas de *melting* utilizando el aparato LightCycler y RNA master *Sybr Green mix* utilizando oligonucleótidos específicos que amplifican secuencias que contengan el exón 4 a partir de mRNA de fibroblastos control y de la línea celular como se observa en la figura. No se encontró transcrito normal asociado a la mutación y sí se amplificó un transcrito correctamente procesado a partir del RNA de la línea control.

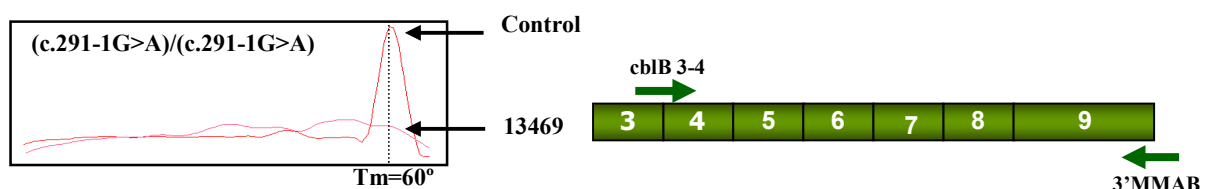


Figura 17: Análisis de curvas de *melting* de una línea celular control y del paciente portador en homocigosis de la mutación **c.291-1G>A**. Los resultados mostrados indicarían que en la línea celular del paciente no se detectan transcritos normales. Los oligonucleótidos utilizados en el proceso de amplificación se muestran en la figura. El primer cblB 3-4 hibrida entre el exón 3 y el exón 4 por lo que solo se rescatarían transcritos portadores de ambos exones.

4.2.2.2 Estudio de la mutación c.584G>A (pacientes 19235 y 19244).

Los resultados del perfil transcripcional del paciente 19235 portador de la mutación **c.584G>A** indicaron la existencia de 3 fragmentos de diferente tamaño (Figura 18). Se realizó el análisis de la secuencia de las tres bandas que resultaron de realizar una RT-PCR convencional detectándose un transcrito normal de mayor tamaño que portaba la mutación c.287T>C (p.I96T) en homocigosis y un transcrito de menor tamaño con la delección del exon 7 debido a la presencia de la mutación **c.584G>A** que afecta el sitio 5' donador de *splicing* del intrón 7 del gen *MMAB* produciendo el *skipping* de este exón, formándose como consecuencia una proteína *MMAB* truncada (p.S174fs). El transcrito mayor es la mezcla de ambos transcritos (heteroduplex).

Para testar si se producía *splicing* normal en las células del paciente, se realizó una RT-PCR con oligonucleótidos específicos que selectivamente amplificarían secuencias que contengan el exón 7. No se encontraron transcritos correctamente procesados con el cambio **c.584G>A** en heterocigosis, como cabría esperar si se hubiera producido *splicing* normal en ambos alelos. Sólo se consiguió amplificar el transcrito portador de la variante normal c.584G generado a partir del alelo portador de la mutación missense p.I96T, incluso cuando la línea celular se creció en presencia de altas concentraciones de OHCl.

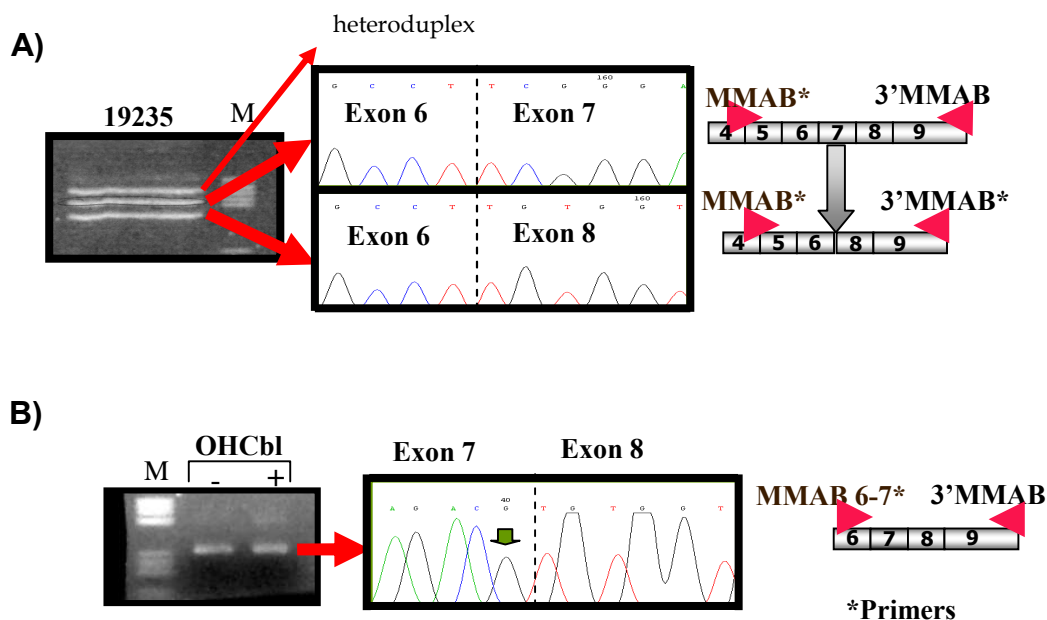


Figura 18: Perfil transcripcional de la línea celular 19235 (cb1B). **A)** Patrón de RT-PCR y análisis de la secuencia de las dos bandas amplificadas a partir de fibroblastos. La secuencia indica que la mutación c.584 G>A afecta al correcto procesamiento del mRNA. En la figura se muestran la localización de los oligonucleótidos utilizados. **B)** Patrón de RT-PCR a partir de mRNA de los fibroblastos tratados y sin tratar con OHCl. Las PCR se han realizado con un oligonucleótido que hibrida entre el exón 6 y 7. La secuenciación del transcrito obtenido identificó el nucleótido mutante c.584G generado a partir del alelo

portador de la mutación I96T por lo tanto no se detecta transcrito correctamente procesado con el cambio c.584A portando la mutación puntual p.R195Q.

Con el propósito de analizar la presencia de transcritos mutantes portadores de la mutación p.R195H, generados si se produjera un *splicing* normal, en líneas celulares procedentes de otros tejidos se procedió a su estudio funcional en un modelo celular de *splicing* usando minigenes. Las regiones exónicas de interés que incluyen el exón 6 y 7 del gen *MMAB*, junto con sus secuencias intrónicas adyacentes, de un individuo normal y del paciente con la mutación c.584G>A, fueron amplificadas y clonadas en el vector de estudio del proceso de *splicing* pSPL3 (Figura 21). Este vector contiene la secuencia donadora y aceptora de *splicing* del virus HIV.

Tras la transfección con la construcción normal y mutante en una línea establecida humana de hepatoma (Hep3B), en una línea establecida de riñón de mono verde (COS7), una línea celular establecida humana de cáncer de ovario (HeLA) y en una línea establecida humana embrionaria de riñón (HEK293), se analizó el patrón de *splicing* obtenido por RT-PCR. El estudio del patrón de bandas se realizó utilizando dos pares de oligonucleótidos, un par específicos del vector (SA2 y SD6) y otro par específico para amplificar selectivamente secuencias que contuvieran incluido el exón 7. Todos los productos obtenidos fueron analizados mediante secuenciación cíclica directa.

Cuando se analizó el perfil transcripcional utilizando el par de oligonucleótidos del vector (SA2 y SD6) se observa la inclusión de los exones 6 y 7 tras la transfección con el minigen normal (c.584G), mientras que los resultados en el perfil de *splicing* con la mutación (c.584A) siempre se detectaba el *skipping* del exón 7 (datos no mostrados). En la Figura 21 podemos ver el patrón de *splicing* cuando se introduce la construcción normal y mutante en los distintos tipos celulares y el análisis utilizando oligonucleótidos que específicamente amplifican secuencias que contengan el exón 7. Se observa un *splicing* correcto del exón 6 en todos los casos tras la transfección con el mutante y en COS7 y HEK293 se observa una banda de mayor tamaño que corresponde a la inserción de un fragmento de intrón del vector por elección de un sitio 5' críptico de *splicing* del vector cuando se introduce la construcción mutante. Sin embargo, cuando se introduce la construcción normal, se observa el correcto *splicing* de ambos exones. (Figura 19). En las células HEK293 transfectadas con el clon mutante se consiguió amplificar una banda que contenía la secuencia correctamente procesada con el exon 6 y 7. Los resultados en Hep3B son similares a los obtenidos en células COS7 (datos no mostrados).



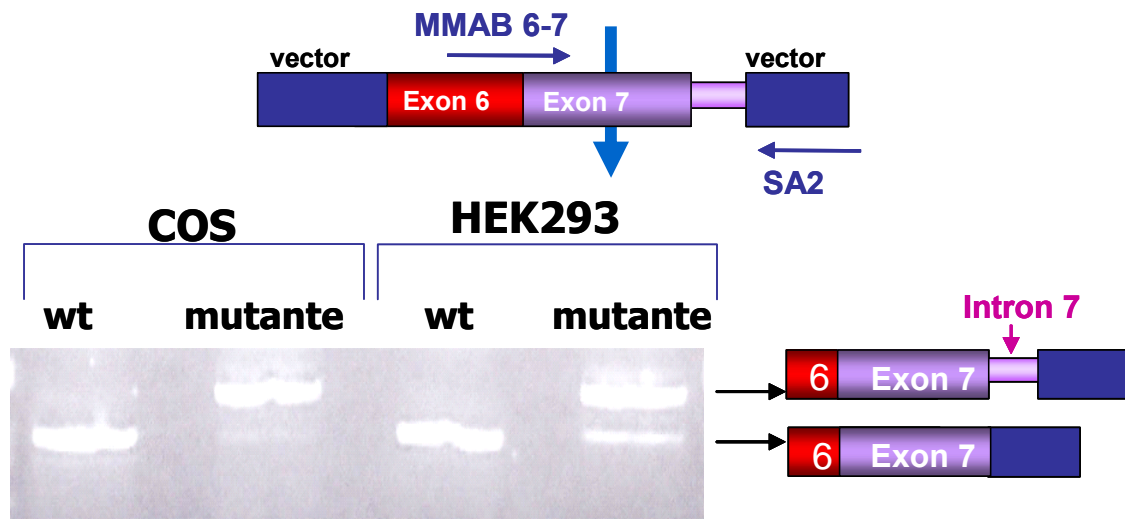


Figura 21: Perfil transcripcional de las células COS7 y HEK293 transfectadas con la construcción normal y mutante. Los minigenes contruidos contienen los exones 6 y 7 del gen *MMAB*, las cuencia completa del intrón 6 y las secuencias intrónicas adyacentes. Tras el aislamiento del mRNA total de células COS7 y HEK293 transfectadas con los correspondientes minigenes, los productos derivados del minigen fueron amplificados por RT-PCR y visualizados en geles de agarosa con bromuro de etidio. Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados para amplificar específicamente transcritos que contuvieran el exón 7 (MMAB6-7). Tanto en HEK293 como en COS7 se observa una única banda al transfectar con la construcción wt que corresponde al cDNA completo wt y dos bandas al transfectar con la construcción mutante: la de mayor tamaño corresponde a un transcrito con ambos exones y un fragmento del intrón 7, tras elegir un sitio 5' de *splicing* del vector y la de menor tamaño es un transcrito normal.

4.2.2.3 Estudio de la mutación c.562G>C (paciente 21431).

El cambio c.562G>C en el último nucleótido del exón 2 del gen *MMAA* aunque está al final del exón y afecta a una base conservada en el 80% de los genes humanos, no parece tener efecto sobre el correcto procesamiento del mRNA cuando se analiza mediante RT-PCR utilizando RNA total de fibroblastos del paciente. Solo se ha conseguido obtener el transcrito con el exón 2 eliminado utilizando oligos que hibridan entre los exones 1 y 3. El cambio G por C produce una ligera disminución del valor de *splicing* de 1 a 0.98. Por lo tanto, posiblemente genere un transcrito completo con el cambio de aminoácido p.R188G.

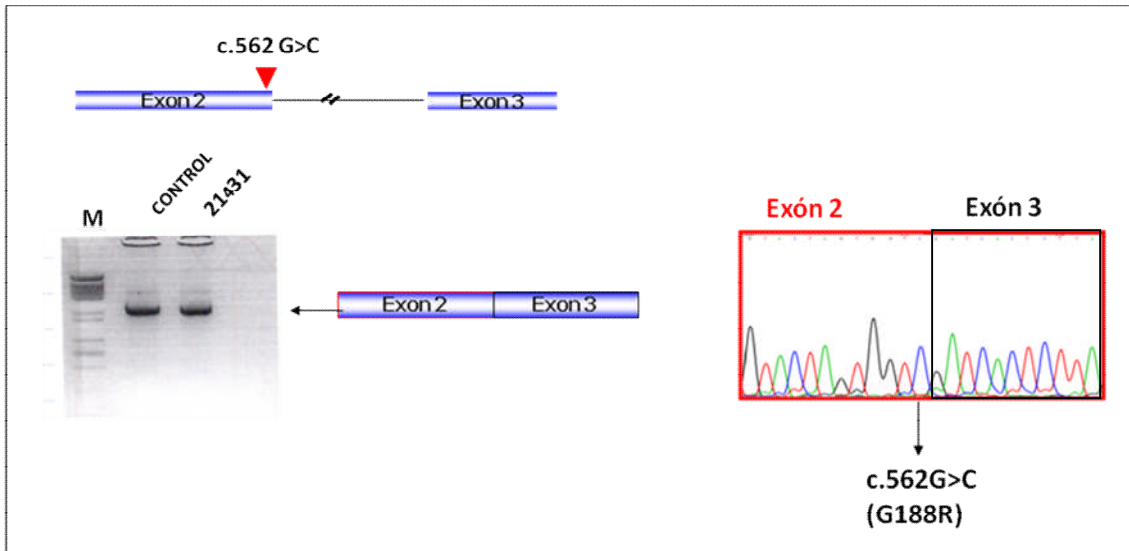


Figura 20: Análisis mediante RT-PCR del perfil transcripcional del paciente 21431. Se muestra el fragmento de secuencia donde se observa el cambio c.562G>C.

4.2.3 Estudios funcionales de mutaciones localizadas en el interior de intrones.

Para probar que los cambios intrónicos identificados en los pacientes pertenecientes al grupo de complementación *mut* (c.1957-989A>G, c.1957-891C>A y c.1957-920C>A), son la causa de la inclusión del pseudoexón de 76 pb en el mRNA de los pacientes, se estudió mediante minigenes en un sistema celular de *splicing* el patrón de *splicing* asociado a estos cambios. Se realizaron construcciones con el pseudoexón normal y los diversos mutantes y sus secuencias intrónicas flanqueantes en el vector pSPL3. Se utilizaron células de hepatoma humano para intentar demostrar el efecto de las mutaciones en el contexto de expresión de las células hepáticas (Figura 23).

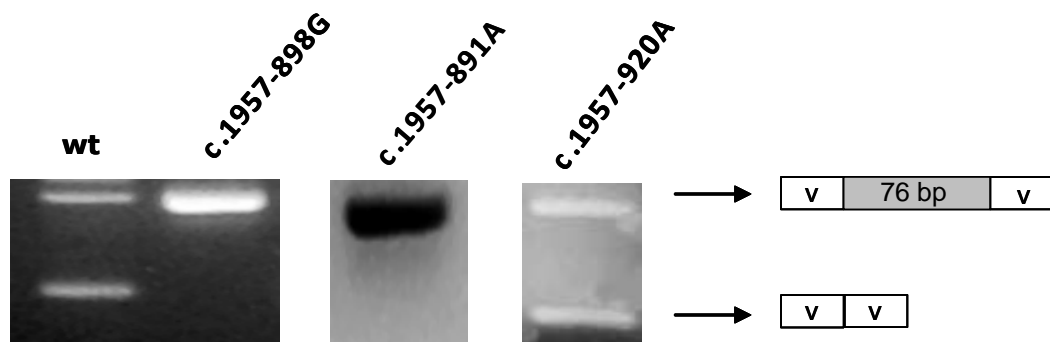


Figura 21: Perfil de transcripción de las células Hep3B transfectadas con la construcción normal genómica y las mutaciones (c.1957-898G, c.1957-891A e c.1957-920A). Los resultados del patrón mediante RT-PCR utilizando *primers* específicos del vector se muestran utilizando representaciones esquemáticas de los transcritos obtenidos, que fueron caracterizados mediante secuenciación. V = secuencias exónicas del vector.

El minigen wt produce dos bandas que corresponden a la inserción del pseudoexón y al evento de *splicing* normal entre los sitios de *splicing* del vector. La construcción mutante c.1957-891A y la construcción c.1957-898G resultaron en la completa inclusión del pseudoexón, pero en el caso de la construcción mutante c.1957-920A no se vieron diferencias significativas con la construcción normal. Esto sugiere que el cambio c.1957-920A no activa la inserción del pseudoexón, al menos no de forma mayoritaria y, si lo hace, la construcción del minigén no es capaz de reproducir la situación *in vivo*. En todos los casos se realizó un análisis de secuencia para confirmar la identidad de los transcritos.

4.3 TERAPIAS MODULADORAS DE MUTACIONES DE *SPLICING* EN ACIDURIA METILMALÓNICA.

4.3.1 Restauración del *splicing* correcto utilizando oligonucleótidos antisentido.

Para demostrar que estos cambios son causantes de enfermedad y para intentar rescatar la expresión del gen *MUT* en fibroblastos de pacientes, hemos investigado la posibilidad de redireccionar el procesamiento de los transcritos mediante el uso de oligonucleótidos antisentido modificados tipo morfolin (AMO). Los oligonucleótidos que se usaron son complementarios a los sitios 5' o 3' de *splicing* de las secuencias intrónicas insertadas.

Las condiciones óptimas para el tratamiento con oligonucleótidos antisentido se determinaron para cada línea de fibroblastos. Tras la transfección con los correspondientes AMO dirigidos contra los sitios 3' o 5' de *splicing* del pseudoexón se procedió al análisis del perfil transcripcional mediante la RT-PCR de la línea celular 11064, recogiendo las células a las 24, 48 y 72 horas post-transfección. Los resultados obtenidos con esta línea indicaron que se conseguía la recuperación funcional a las 24 horas post-transfección, siendo este el tiempo utilizado con el resto de las líneas celulares estudiadas. Los resultados obtenidos, sugieren una corrección del *splicing* dependiente de dosis y del AMO usado (Figura 22A). La no inclusión de la secuencia intrónicas en cada caso, fue específica de secuencia ya que cuando se utilizaron los oligonucleótidos antisentido específicos de pseudoexones identificados en otros genes no se observó ningún efecto en la inclusión del pseudoexón de 76bp identificado en el gen *MUT*. No se observa mRNA correctamente procesado en líneas sin tratar con AMOs.

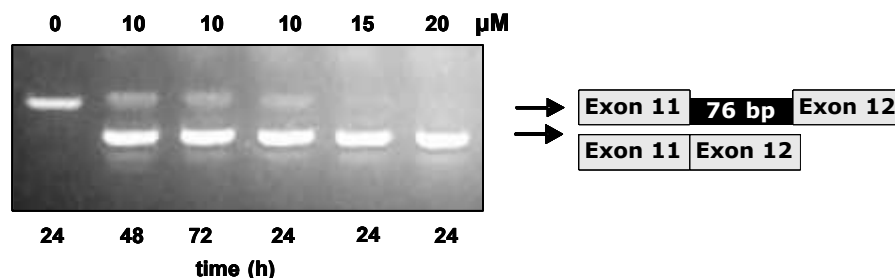
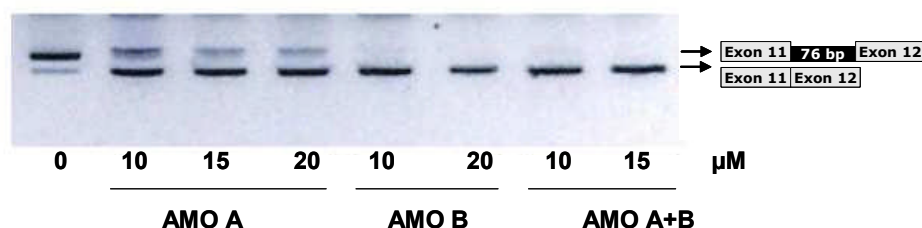
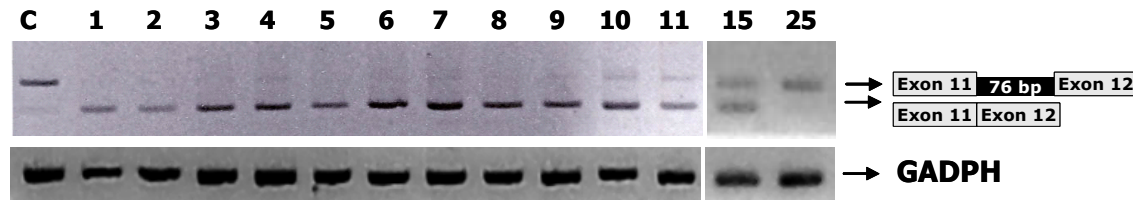
A) c.1957-891C>A (línea celular 11064)**B) c.1957-898A>G (línea celular 10599)****C) Time course (línea celular 11064)**

Figura 22: Corrección del *splicing* aberrante utilizando AMOs complementarios a los sitios 5' (AMOB) o 3' (AMOA) de *splicing*. **A)** Análisis de RT-PCR del paciente que porta la mutación c.1957-891C>A tratado con diferentes concentraciones de AMO complementario al sitio 5' de *splicing* y en diferentes tiempos (AMOB). **B)** Análisis de RT-PCR de uno de los pacientes que portan la mutación c.1957-898A>G tratado con diferentes concentraciones de oligonucleótidos complementarios a ambos sitios de *splicing* y de mezcla de ellos tras la transfección durante 24h. **C)** Estudio en el tiempo de recuperación de los transcritos normales en la línea celular 11064 mediante análisis de RT-PCR para estudiar la estabilidad del mRNA correctamente procesado tras un único tratamiento con 15 μM de AMOB. El gel inferior corresponde a la amplificación del mRNA de la GADPH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), con el propósito de normalizar los resultados de la RT-PCR.

En las líneas celulares de los pacientes 10599 y 14969, que portaban la mutación c.1957-989A>G y en las líneas de los pacientes 25848 y 27547, que portaban la mutación c.1957-920C>A, se realizó el mismo ensayo. En ambos casos se utilizaron oligonucleótidos complementarios a los sitios 5' o 3' de *splicing* de la secuencia insertada recogiendo las células a las 24h. El análisis mediante RT-PCR mostró que el

tratamiento impide la inclusión del pseudoexón en las líneas celulares portadoras de ambas mutaciones, en dosis dependientes de la línea celular (Figura 22B)

Para estudiar la estabilidad del mRNA correctamente procesado, los fibroblastos se trataron con 15 μ M AMO B y se recogieron las muestras durante 25 días y, como se observa en la figura 22C, el mRNA correctamente procesado es estable aproximadamente 11 días, tras lo cual habría que volver a transfectar.

Se realizó un estudio utilizando Vivo-Morfolinos, oligonucleótidos antisentido modificados unidos covalentemente a un octa-guanidin-dendrímtero que se utiliza para mejorar la vehiculización *in vivo* (Li and Morcos, 2008). No se encontraron diferencias significativas al uso de EndoPorter como vehículo de transfección o Vivo-Morfolinos en los patrones de RT-PCR.

Con el propósito de asegurarnos de que el fragmento amplificado de menor tamaño obtenido tras la transfección era producto del efecto del AMO y no había desaparecido la banda con la inserción de 76bp por efecto del NMD, se procedió a secuenciarla, observándose la presencia de la mutación *missense* p.L617R y del SNP p.V671I en heterocigosis (Figura 23).

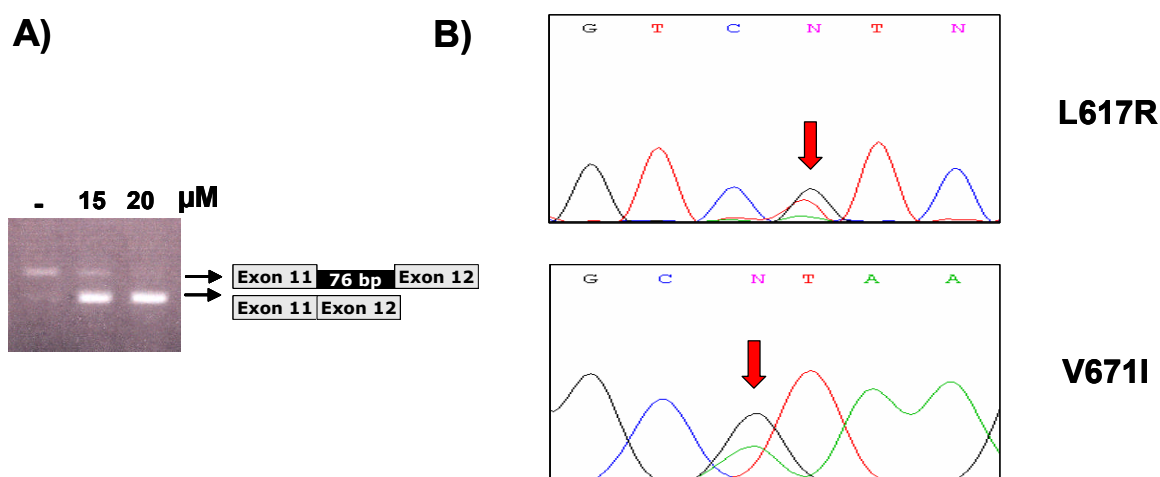


Figura 23: Análisis del efecto del Vivo-Morfolinos: A) Patrón de RT-PCR tras la transfección con vivo-morfolino a distintas concentracones de AMOB recogidas a las 24h. Análisis mediante RT-PCR del mRNA de la línea celular 14969 tratado con Vivo-Morfolinos B) Análisis de secuencia de la banda de menor tamaño obtenida por RT-PCR tras el tratamiento con 20 μ M de Vivo-Morfolinos.

Se realizó un test de estabilidad del mRNA correctamente procesado en fibroblastos del paciente 11064 tratados con Vivo-Morfolino durante 25 días tras la administración única de 20 μ M de AMOB en el que se observó que el transcrito aberrante empezaba a ser evidente al quinto día aunque sus niveles permanecían bajos, como puede verse en la figura 24.

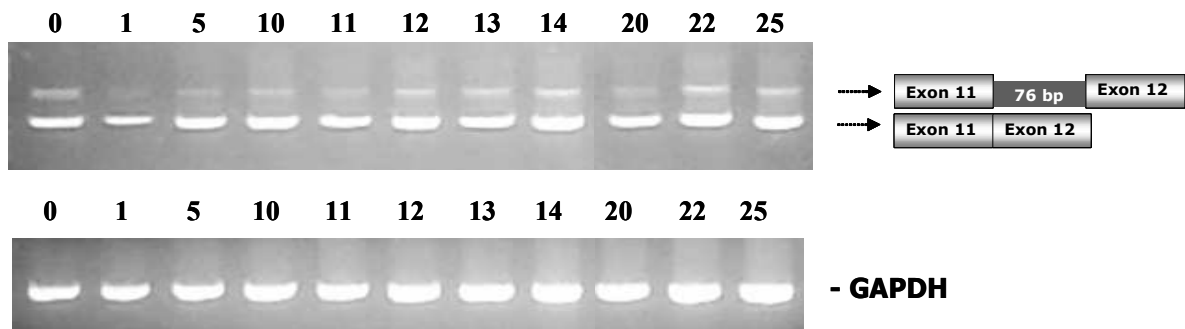


Figura 24: Efecto de la transfección con Vivo-Morfolino de la línea celular 11064 en el procesamiento de mRNA. Estudio en el tiempo mediante análisis de RT-PCR para estudiar la estabilidad del mRNA correctamente procesado del paciente 11064 tratado con Vivo-Morfolinos.

4.3.2 Restauración de la actividad enzimática MCM en líneas de fibroblastos de pacientes

Para determinar si los análisis mediante RT-PCR se correlacionaban con una restauración de la actividad enzimática, se midió la incorporación de ^{14}C -propionato como determinación de la actividad MCM en los fibroblastos de los cinco pacientes donde se detectaron los cambios nucleotídicos intrónicos internos. La actividad MCM se rescató en fibroblastos de pacientes 11064, 10599 y 14969 tratados con AMO B a las 48 o 72h después del tratamiento, sin diferencias significativas entre ambos.

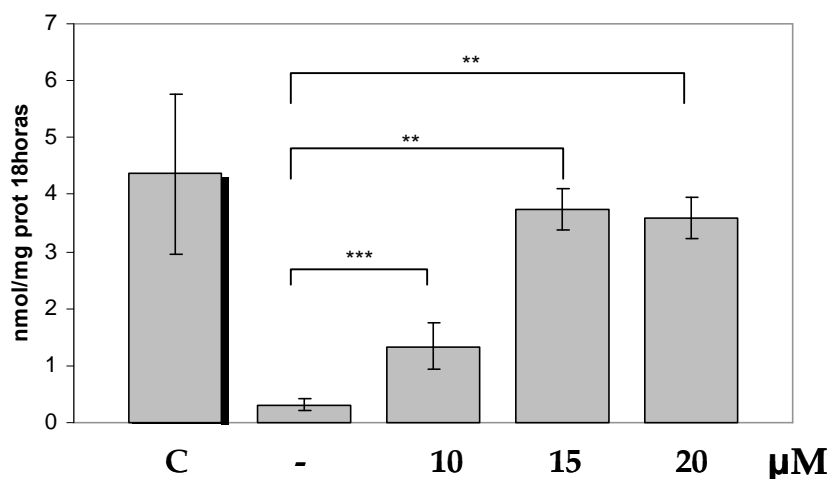


Figura 25: Corrección de la actividad MCM después del tratamiento con AMO B en la línea celular 11064. Se muestra un aumento estadísticamente significativo recuperando la actividad MCM a nivel de las muestras control cuando se tratan las células con 15 o 20 μM de AMOB tras 48h de tratamiento. Los datos muestran la media \pm desviación standard de al menos 3 experimentos independientes y los datos de los controles se obtuvieron de 4 líneas celulares independientes (*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$)

En el paciente 11064 se rescató la actividad a las 48h (Figura 25). Los niveles de incorporación de ^{14}C -propionato son cercanos al 40% comparados con el control cuando se tratan las células con una concentración de $10\mu\text{M}$ y cercanos al 100% si se usan concentraciones mayores ($15\text{-}20\mu\text{M}$). No se produce ningún efecto en la actividad MCM cuando se tratan con AMO B otras células *mut⁰* que portan diferentes mutaciones e incluso que exhiben ciertos niveles de inserciones intrónicas.

En los pacientes 10599 y 14969, la actividad se rescató a las 48h alcanzando entre un 25% y un del 100% con respecto al control dependiendo de la dosis de AMO y de la línea celular (Figuras 26 y 27, respectivamente), mientras que en los pacientes 25848 y 27547 no se recató actividad MCM a la concentración empleada, de $30\mu\text{M}$ de AMO B (Figura 28).

Los resultados obtenidos sugieren que la restauración de las actividades enzimáticas depende de la línea celular, el oligonucleótido utilizado e incluso la concentración a la que se ha utilizado. En los pacientes 10599 y 14969, la actividad MCM es similar al control utilizando $30\mu\text{M}$ de cada AMO o con ambos AMOs. Los resultados obtenidos fueron similares utilizando tanto Endoportier como Vivo-Morfolinos.

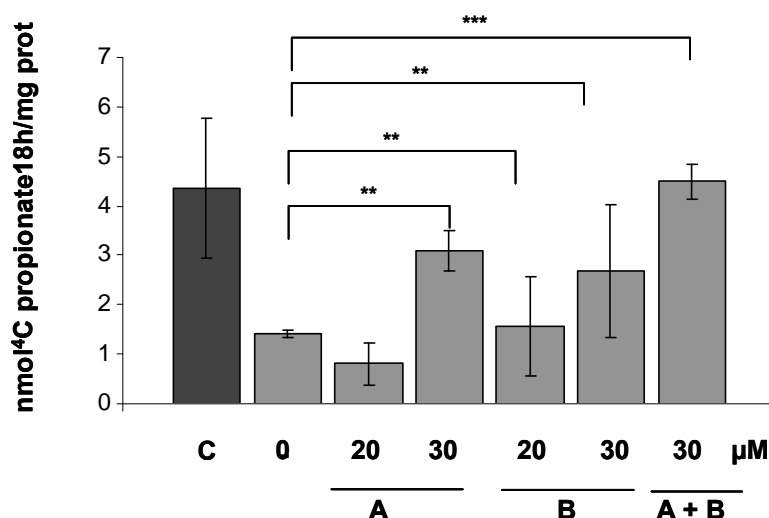


Figura 26: Corrección de la actividad MCM después del tratamiento con AMOs. Medida de la actividad en la línea celular del paciente **10599**. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes y los datos de los controles se obtuvieron de 4 experimentos independientes (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$)

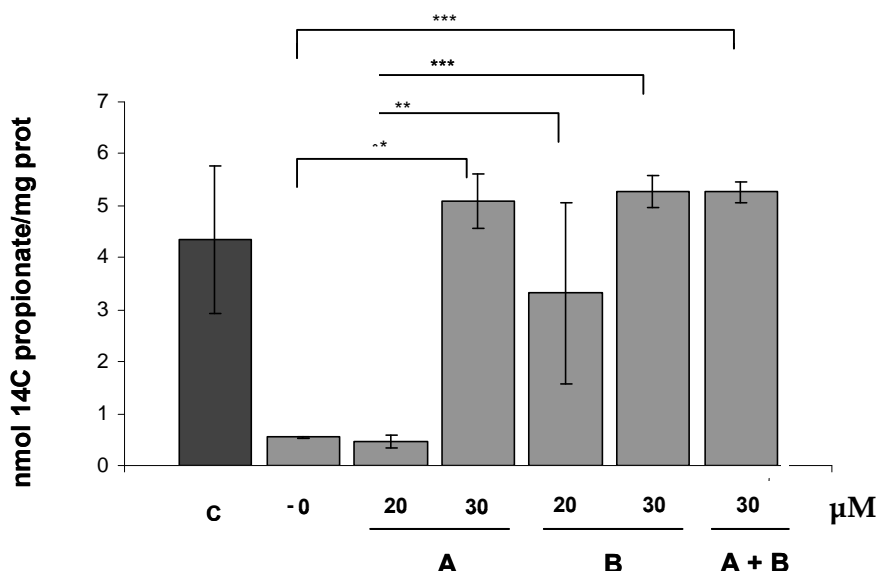


Figura 27: Corrección de la actividad MCM después del tratamiento con AMO. Medida de la actividad en la línea celular del paciente **14969** tratadas con diferentes concentraciones de AMO A, AMO B o mezcla de ambos. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes y los datos de los controles se obtuvieron de 4 líneas celulares independientes (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$)

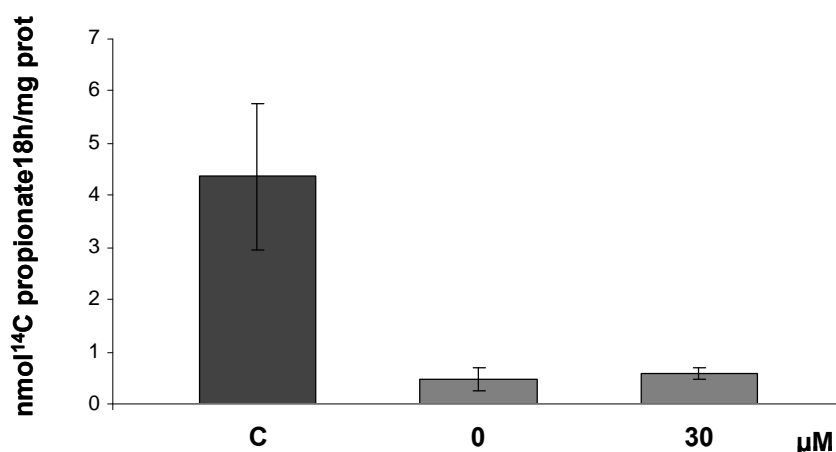


Figura 28: Corrección de la actividad MCM después del tratamiento con AMO. Medida de la actividad en la línea celular del paciente **25848** tratado con 30μM de AMO B. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes y los datos de los controles se obtuvieron de 4 líneas celulares independientes (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$)

Se han realizado análisis mediante microarrays de expresión en el paciente 11064 para comprobar si el tratamiento con AMOs produce algún efecto sobre otros genes que no sean el objetivo del tratamiento. En los resultados obtenidos (Figura 29) se muestra que el tratamiento con 30μM de AMO B no produce aumento ni descenso en la expresión de ningún gen.

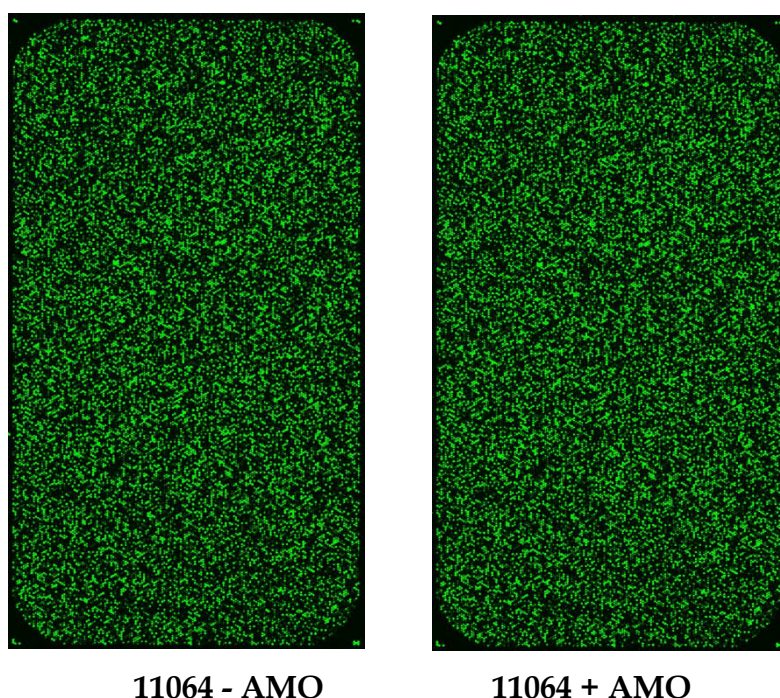


Figura 29: Microarrays de expresión del paciente 11064: Comparativa del tratamiento con 30 μ M de AMO B. No se muestra aumento o descenso en la expresión de ningún gen después del tratamiento con AMO.

4.3.3 *Análisis del efecto de transfección sobre el stress celular.*

Se ha descrito una elevación del stress oxidativo en líneas celulares de pacientes *MUT* (Richard, et al., 2007) así que para determinar si el tratamiento con AMOs que resulta en la restauración de la actividad enzimática tiene algún efecto en el stress oxidativo en las líneas celulares, se ha evaluado el nivel de ROS en la línea celular 11064 tratadas y sin tratar con AMO y utilizando EndoPorter o con Vivo-Morfolinos.

Aunque se restauró la actividad MCM y no se prevé que haya ácido metilmalónico ni metabolitos secundarios en las líneas celulares de los pacientes, el tratamiento con AMO no tiene un efecto significativo sobre niveles de ROS cuando las células se trataron con AMOs y fueron transfectadas con EndoPorter. Las células tratadas solo con EndoPorter presentaron un comportamiento similar a las tratadas con EndoPorter y AMO.

En el caso del Vivo-Morfolino los resultados muestran que el Vivo-Morfolino no incrementa la producción de ROS después de un tratamiento con AMO de 2 o 7 días con una dosis o varias dosis cada 48 horas. En células tratadas con 20 μ M de AMO dirigido al sitio 5' de *splicing* se observó que los niveles de ROS disminuyeron un 25%.

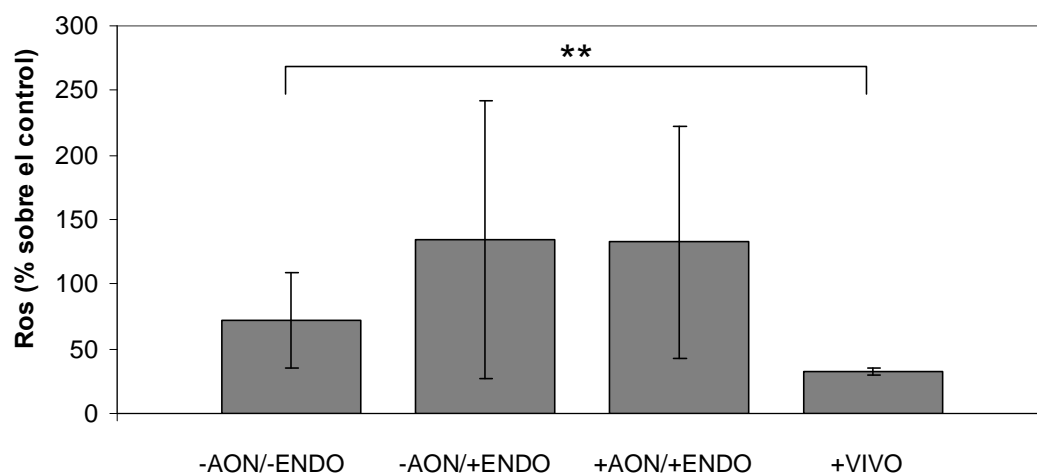


Figura 30: Medida del stress oxidativo en células tratadas con AMO y EndoPorte o Vivo como agente transfectante. Medida del nivel de ROS en células tratadas con 20 μ M de AMOB y transfectadas con EndoPorter o Vivo-Morfolino. Los datos muestran la media \pm desviación standard de al menos 3 experimentos independientes y los datos de los controles se obtuvieron de 3 líneas celulares independientes (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$). Se ha considerado 0 al valor del control.

5. DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo ha sido analizar los datos clínicos, las características bioquímicas y el genotipo en un grupo de pacientes con aciduria metilmalónica aislada y con homocistinuria, así como analizar los mecanismos moleculares responsables de estas patologías, con el propósito de poder aplicar nuevas aproximaciones terapéuticas. El análisis genético de los pacientes con MMA aislada y con homocistinuria ha permitido asignar de forma segura el gen responsable de la patología clínica lo que permite el estudio genético prenatal y postnatal de la enfermedad en familias afectadas tanto de individuos sintomáticos como asintomáticos.

En este trabajo hemos llevado a cabo el análisis genético de 22 pacientes con aciduria metilmalónica aislada y un paciente con homocistinuria pudiendo asignar 10 al grupo de complementación *cblA*, 6 al grupo *cblB*, 5 al grupo *mut* y uno al grupo de complementación *cblE*. La mayoría de los pacientes fueron estudiados después de la presentación de los síntomas clínicos, sólo un *cblB* fue estudiado tras el diagnóstico y fallecimiento de un hermano. La identificación del defecto se basó inicialmente en estudios bioquímicos y celulares llevados a cabo en el laboratorio como son la determinación de la actividad metilmalonilCoA mutasa, la incorporación de ¹⁴C-propionato en presencia y ausencia de cobalamina y estudios de complementación celular somática en fibroblastos de los pacientes. En cualquier caso ha sido la identificación de variantes de secuencia y su estudio funcional posterior para catalogarlas como mutaciones causantes de enfermedad lo que ha permitido la confirmación del gen afectado

En el gen *MMAA* todos los cambios identificados menos uno, c.562G>C, son de parada prematura de la traducción, bien mutaciones *nonsense* (p.R145X, p.Q133X, p.Q120X, p.R22X) o bien pequeñas duplicaciones o inserciones (p.L272fs, p.T198fs, p.P152fs) y todas se encuentran en los 4 primeros exones del gen *MMAA*. Varios de los cambios nucleotídicos que causan mutaciones *nonsense* se han generado sobre el codón CGA o CAA que codifica para arginina y glutamina respectivamente. En el codón CGA se localiza el dinucleótido CpG que por desaminación oxidativa de la citosina se convierte en un codón de stop o TGA siendo así un codón de alta mutabilidad o *hot-spot*. En el caso de las pequeñas inserciones y deleciones identificadas, en general parecen ocurrir en muchos casos por duplicaciones de bases vecinas como ha sido descrito en el 61% de este tipo de mutaciones recopiladas en la base de datos del *Human Genome Variation Society* (Antonarakis, et al., 2000).

En *MMAA* todas las mutaciones identificadas, con excepción de la mutación c.562G>A, son *a priori* causantes de enfermedad ya que todas provocan la parada prematura de la traducción, eliminándose toda la región carboxilo terminal de la proteína. En el caso del cambio nucleotídico c.562G>A el estudio del perfil transcripcional de la línea celular del paciente sugiere que el cambio de la base G, que afecta a la última base del exón 2, no afecta al correcto procesamiento del mRNA como

cabría esperar ya que la posición -1 de la secuencia 5' consenso de *splicing* se considera una posición clave que se conserva en el 80% de los genes (Nissim-Rafinia and Kerem, 2002). Este resultado es aplicable a otras mutaciones similares como el cambio c.742C>A en el último nucleótido del exon 7 del gen de la fenilalanina hidroxilasa que tampoco causa un defecto de *splicing* y sin embargo es una mutación *missense* (p.P281L) muy severa sin proteína inmunorreactiva ni actividad funcional (Ellingsen, et al., 1999). Los resultados obtenidos indicarían que se podría generar una proteína MMAA con una mutación *missense* (p.R188G). Este cambio es un cambio no conservativo, de un aminoácido cargado a un aminoácido pequeño y sin carga como la glicina, lo que sugeriría que esta variante de secuencia podría ser una mutación causante de enfermedad. En cualquier caso estudios funcionales de la mutación permitirán la confirmación del efecto patológico de la mutación *missense* p.R188G.

En cuanto al espectro mutacional, en el gen MMAA la mutación más frecuentemente encontrada en nuestra población y en poblaciones históricamente relacionadas, como es la población chilena, al igual que en otras poblaciones (Lerner-Ellis, et al., 2004; Dobson, et al., 2002b; Yang, et al., 2004) es la mutación p.R145X (c.433C>T) identificada en el 50% de los cromosomas mutantes de este trabajo. El resto de los cambios son menos frecuentes. Además se han caracterizado un elevado número de pacientes homocigotos (80%). La presencia de este tipo de mutaciones que provocan la parada prematura de la traducción y la ausencia de prácticamente pacientes portadores de mutaciones de cambio de aminoácido, hace pensar que el diagnóstico de estos pacientes puede ser compatible con una selección clínica y que otros pacientes con presentación tardía y más suave pueden escaparse (Mort, et al., 2008). Serán los estudios genéticos de pacientes detectados en el *screening* neonatal ampliado lo que ponga de manifiesto la existencia de pacientes con fenotipos más suaves, y que probablemente sean portadores de otras mutaciones prevalentes como ha ocurrido en otras enfermedades metabólicas hereditarias como la acidemia isovalérica (Ensenauer, et al., 2004), o los defectos en acilCoA deshidrogenasa de cadena media (Andresen, et al., 2001). En estas enfermedades se han descrito mutaciones *missense* muy frecuentes y que luego sorprendentemente han aparecido hermanos asintomáticos con el mismo genotipo y características bioquímicas similares.

En general, las mutaciones que dan lugar a codones de parada prematuros de la traducción o mutaciones PTC (*premature termination codon*), lejanos del sitio original y que implican eliminación de dominios esenciales para la función proteica son consideradas mutaciones nulas, ya que producen generalmente disminución de los correspondientes mRNA evitando la creación de proteínas truncadas (Maquat, 2004), con actividad residual indetectable. Aunque, las mutaciones que producen proteínas truncadas en los primeros aminoácidos están normalmente asociadas a presentaciones neonatales severas en el caso de la MMAA, todos los pacientes presentan la forma infantil menos severa de la enfermedad con respecto a los pacientes pertenecientes a

los grupos de complementación *mut* y *cblB*, y además todos han llegado a una edad adulta con un buen pronóstico clínico. Los genotipos tan severos encontrados en los pacientes *cblA* descritos en este trabajo y por otros autores (Lerner-Ellis, et al., 2004; Yang, et al., 2004) no explican la relativamente buena evolución de estos pacientes (mayor supervivencia, menor afectación neurológica, ausencia de daño renal) en comparación con otros pacientes con aciduria metilmalónica aislada.

En cuanto a la respuesta en los pacientes *cblA* tanto *in vitro* como *in vivo*, visualizada con disminuciones de los niveles de ácido metilmalónico en sangre y orina no es fácil de explicar en los pacientes *cblA* portadores de mutaciones de parada prematura de la traducción en ambos alelos. En otras enfermedades con respuesta a vitaminas/cofactores parece existir una clara relación entre la respuesta clínica y bioquímica y la actividad residual de proteínas con cambios *missense* que mantienen proteína inmunorreactiva (Ledley, et al., 1990; Pey, et al., 2004). Algunas hipótesis propuestas para explicar la respuesta a vitamina B₁₂ están basadas en la hipotética función de la proteína MMAA. Sin embargo, ninguna ha sido demostrada. Por una parte, basado en la secuencia de la proteína se ha propuesto que la MMAA pertenece a una superfamilia de proteínas implicadas en transporte lo que podría significar que podría ser un componente del transporte implicado en la translocación de la B₁₂ al interior de la mitocondria (Dobson, et al., 2002b) y que aunque no se exprese la proteína MMAA, concentraciones farmacológicas de B₁₂ podrían atravesar la membrana por difusión pasiva. Recientemente, se ha propuesto que la proteína MMAA puede tener un papel importante en la protección o reactivación de la MCM basada en la homología de secuencia con *MeaB* en la bacteria *Methylobacterium estorquens* (Korotkova and Lidstrom, 2004). La función de *MeaB* sería necesaria para la protección de la mutasa contra la inactivación durante la catálisis (Padovani and Banerjee, 2006). De esta forma la posible explicación para la respuesta en células *knock-out cblA* puede ser el incremento en el *pool* de B₁₂ que hace que aumente la cantidad de holoenzima activa aunque algunas MCM estén funcionalmente inactivas y actuar como una reactivasa como ocurre en otras proteínas como la glicerol dehidratasa y la diol dehidratasa, ambas presentes en bacterias (Kajiura, et al., 2001). Otra posible explicación puede ser un efecto de la B₁₂ en la activación de la transcripción del gen *MUT*. Aun así, aunque se ha descrito la regulación génica dependiente de B₁₂ y su consecuente aumento de actividad de la enzima metionina sintasa, parece que la proteína MCM no se ve afectada (Oltean and Banerjee, 2003) ya que su actividad no cambia cuando suplementamos el medio con B₁₂ (Gulati, et al., 1999). La investigación del mecanismo de respuesta a B₁₂ utilizando células *knock-out cblA* debe ser objeto de futuras investigaciones.

En este sentido la cuantificación del mRNA MMAA que muestra niveles normales o cercanos a los normales en las líneas estudiadas, indicaría que los transcritos evaden el sistema de control o vigilancia de los mRNA portadores de

mutaciones PTC. En la actualidad han aparecido numerosas excepciones, de transcritos portadores de PTC que no son degradados pudiendo así generar proteínas truncadas con posible actividad residual. Este fenómeno se ha descrito asociado a determinados genes y asociado a diferencias intertisulares e interindividuales en la expresión de las proteínas que componen el NMD, lo que lo convierte en un modificador del fenotipo (Khajavi, et al., 2006; Kuzmiak and Maquat, 2006). En el caso de la aciduria metilmalónica combinada con homocistinuria tipo *cblC* se ha reportado que los pacientes portadores de la mutación p.R132X mantienen niveles normales de mRNA mientras que pacientes portadores de otras mutaciones *nonsense* como p.R153X y p.R161X, presentan niveles disminuidos de mRNA *MMACHC* (Lerner-Ellis, et al., 2009). Aún no se sabe como estos mRNA escapan a este mecanismo, sin embargo el editado del RNA se ha propuesto como mecanismo en APOB (Dantas, et al., 2005). En otros casos, la reiniciación de la traducción en un ATG aguas abajo del residuo afectado se ha propuesto como mecanismo para la evasión del NMD asociado a mutaciones cercanas al codon de iniciación original (Saridakis, et al., 2004; Skandalis and Uribe, 2004). Esta reiniciación de la traducción podría mantener potencialmente funcional la proteína MMAA truncada y podría explicar el fenotipo y la respuesta a vitamina B₁₂ de estos pacientes.

En el caso del gen *MUT*, los estudios sobre la estabilidad del mRNA han revelado que todos los mRNAs portando mutaciones PTC parecen inestables y son degradados probablemente por el sistema NMD haciendo que no debiera encontrarse proteína MCM en estos pacientes. Examinando los casos con mutaciones *missense* tanto en homocigosis como en heterocigosis para los pacientes tanto *mut* como *mut*⁰, ninguna de estas mutaciones afecta a la estabilidad del mRNA como cabría esperar. Los resultados obtenidos de la cuantificación del mRNA en pacientes pertenecientes al grupo fenotípico *mut*⁰ mostraron que la inestabilidad del mRNA no es un mecanismo general implicado en este fenotipo como se ha descrito previamente sino que existen mutaciones *missense* causantes de este fenotipo (Ogasawara, et al., 1994) que mantienen niveles normales de transcritos y que probablemente dan lugar a proteínas altamente inestables.

Una vez identificadas las mutaciones causantes de enfermedad una de las aplicaciones mas interesantes es la investigación en nuevas terapias más individualizadas y dirigidas a recuperar las actividades residuales de las correspondientes proteínas mutantes. En este contexto, en los últimos años, se están utilizando drogas denominadas “*read-through*”, como los antibióticos aminoglucósidos siendo la gentamicina el más eficaz, que permiten la traducción de mRNA portador de mutaciones *nonsense* en fase de lectura y que su acción no afecta al codon de parada original. Se han probado con éxito en modelos animales y celulares de fibrosis cística, distrofia muscular de Duchenne, síndrome de Hurler, etc., resultando en proteínas que retienen cierta actividad residual (Lai, et al., 2004; Linde, et al., 2007; Welch, et al.,

2007), ya que en eucariotas consigue mediante cambios conformacionales en el ribosoma introducir un aminoácido en lugar de parar la traducción.

Sin embargo estos antibióticos tienen fuertes efectos secundarios, sobre todo cuando se prolongan los tratamientos, por lo que mediante rastreos de librerías de pequeños compuestos químicos se han buscado alternativas terapéuticas. En la actualidad existe un tratamiento con la droga PTC124 (Ataluren®) en fase clínica en pacientes de fibrosis cística y distrofia muscular de Duchenne encontrándose una respuesta variable, que parece depender de los niveles de transcritos mutantes que presentan los pacientes así como del codón de parada y de los nucleótidos vecinos al correspondiente codón (Kerem, et al., 2008; Welch, et al., 2007). Estos tratamientos podrían ser aplicables a los pacientes con aciduria metilmalónica tipo *cblA* donde aparecen numerosas mutaciones *nonsense* y además los mRNA portadores de estas mutaciones no son degradados por la maquinaria NMD. En el caso de los pacientes del MMA tipo *mut*, dado que parece que el NMD podría regular la respuesta a la droga, sería necesario la inhibición de este sistema previamente a la administración de fármacos “*read-through*”. Se han ensayado nuevas terapias basadas en la inhibición del NMD que consiguen recuperar el fenotipo normal *in vitro*, como ha sido la enfermedad de Ullrich (Usuki, 2006), aunque como están basadas en la interferencia del factor UPF1 se ven afectados más genes. Así, para que la inhibición incremente de forma específica el correspondiente transcrito portador del PTC en fase, se propone la utilización de oligonucleótidos antisentido dirigidos frente a las secuencias específicas del gen donde se une el complejo SURF impidiendo así su degradación por el sistema NMD (Linde and Kerem, 2008). En la actualidad, los pacientes con MMAuria, especialmente los pacientes MMAA van a formar parte de un ensayo clínico europeo con el fármaco PTC124 (Ataluren®) (Auld, et al., 2009; Du, et al., 2008; Linde and Kerem, 2008).

En el gen *MMAB* se han identificado un total de 7 mutaciones de las cuales tres son cambios de aminoácido (p.R181W, p.R191W y p.I96T). Los cambios *missense* encontrados en el gen *MMAB* son en todos los casos mutaciones *missense* que afectan a residuos muy conservados de la proteína. En el caso de las mutaciones p.R186W y p.R191W son mutaciones previamente descritas (Dobson, et al., 2002a) y que han sido expresadas *in vitro* en sistemas de expresión procariotas (Zhang, et al., 2006) (Fan and Bobik, 2008) por lo cual podemos asegurar que son mutaciones causantes de enfermedad. Las mutaciones **p.R186W** y **p.R191W** están localizadas en la interfase entre subunidades de la proteína homóloga TA1434, ATP:cobalamín adenosiltransferasa, de *T. acidodophilum* donde se ha localizado el centro activo (Saridakis, et al., 2004; Schubert and Hill, 2006). En el caso de la mutación descrita por primera vez en nuestra población **p.I96T** presumiblemente también es causante de enfermedad por afectar a un residuo conservado de la proteína y por ser un cambio no conservativo de una isoleucina por una Treonina (Cotton and Sriver, 1998).

En los casos de pacientes MMA del tipo *chlB* hemos identificado dos fenotipos bioquímicos diferentes, tres líneas celulares no mostraron respuesta *in vitro* a vitamina B₁₂ y tres presentaron respuesta *in vitro* a B₁₂. De las líneas que no respondieron dos pertenecen a pacientes homocigotas para dos mutaciones diferentes [**p.R186W** y **c.291-1G>A (p.G97fs)**] y una pertenece a un paciente compuesto heterocigoto de dos mutaciones que afectan al correcto procesamiento del mRNA (**c.290G>A** y **c.349-1G>C**). El hecho de que los pacientes homocigotos mostraran un fenotipo severo tanto clínico como bioquímico sin respuesta a B₁₂ hace que concluyamos que estas dos mutaciones [**p.R186W** y **c.291-1G>A (p.G97fs)**] son cambios muy severos. En cuanto a la mutación que afecta al *splicing* **c.291-1G>A (p.G97fs)** en análisis del perfil transcripcional de la línea celular del paciente utilizando oligonucleótidos específicos que amplificarían selectivamente secuencias que contuvieran el exón 4, sugieren que no existen transcritos normales con la inclusión del exón 4 por lo que no debería haber proteína ATR, lo cual explica la ausencia de respuesta *in vitro* a vitamina B₁₂ en este paciente.

Sin embargo el paciente compuesto heterocigoto de las mutaciones de *splicing* (**c.290G>A** y **c.349-1G>C**) es un paciente que aunque con presentación neonatal actualmente es clínicamente asintomático aunque sin respuesta *in vivo* e *in vitro* a B₁₂. Este hecho hace sugerir que la delección en fase de los dos aminoácidos, producidos por la activación de un sitio críptico de *splicing* exónico producto de la mutación **c.349-1G>C**, podría retener actividad residual, que podríamos modular mediante la activación de la expresión del gen aumentando los niveles de proteína inmunorreactiva utilizando activadores transcripcionales, como las estatinas. Las estatinas además de ser fármacos inhibidores de la HMG-CoA reductasa, juegan un papel en la activación de las proteínas reguladoras SREBPs (*sterol regulatory element binding proteins*) que actúan sobre promotores de varios genes, entre ellos el del gen *MMAB* que comparte promotor con el gen *MVK* (Mevalonato kinasa) del metabolismo del colesterol (ambos genes están situados cabeza-cabeza en el cromosoma 12) (Murphy, et al., 2007). Además, se podrían analizar librerías de fármacos comerciales que podrían ser potenciales activadores transcripcionales aportando nuevas terapias para el tratamiento de esta y otras enfermedades genéticas humanas como se ha hecho para el gen *MUT* (Buck, et al., 2009; Hu, et al., 2009).

Los tres pacientes que responden a B₁₂ comparten la mutación **p.I96T**. Uno de ellos es portador además de la mutación **p.R191W** que ha sido expresada en *E.coli* como proteína de fusión con GST presentando una K_M ligeramente mas elevada por cobalamina (16 veces mas elevada) (Zhang, et al., 2006) y además ha sido descrita como una mutación con un estabilidad fuertemente comprometida (Fan and Bobik, 2008). Estos resultados podrían indicar que la respuesta a B₁₂ en estos tres pacientes podría ser debido tanto al cambio p.R191W como el cambio, **p.I96T**, localizado fuera de la

interfase del centro activo y que es posible que afecte a las propiedades de plegamiento de la proteína.

Clásicamente, se asume que el mecanismo subyacente a la respuesta a dosis farmacológicas de las correspondientes vitaminas es una constante de Michaelis o K_m aumentada (afinidad reducida) de la enzima mutante por su cofactor. Se ha sugerido que hasta un tercio de las mutaciones son de este tipo, dependiendo del gen afectado (Ames, et al., 2002). Teniendo en cuenta que la mutación p.I96T no es una variante de K_m (datos del laboratorio) se necesita una explicación alternativa para su respuesta *in vitro* asociada. Hay que resaltar que en otras enfermedades, las proteínas mutantes que responden al tratamiento con su cofactor, un defecto cinético no es evidente y hasta la fecha se han sugerido otros mecanismos para la respuesta, incluyendo un efecto estabilizante, mediante regulación de la expresión génica, mediante estabilización del mRNA o simplemente actuando como chaperona química natural (Martinez, et al., 2008; Erlandsen, et al., 2004; Linscheid, et al., 1998). Así, se ha sugerido que el sustrato, los cofactores o los inhibidores tienen efectos en la estabilidad de la proteína y se consideran chaperonas naturales de las correspondientes proteínas mutantes y este podría ser el caso de la B_{12} y la estabilización de las proteínas mutantes ATR. Otra posible explicación es que defectos en la enzima ATR pueden afectar la interacción con las proteínas MMAA o MCM, asumiendo que las tres enzimas pueden existir como un complejo y cantidades elevadas de B_{12} lo estabilizarían y que la vitamina B_{12} , que debido a sus características químicas, se postula que es escoltada a su destino acompañada con las diferentes proteínas en las vías citosólica y mitocondrial, pueda estabilizar los complejos mal ensamblados (Banerjee, 2006). Así las mutaciones p.I96T and p.R191W podrían ser mutaciones de plegamiento y ser potencialmente rescatadas, como intervención terapéutica, usando chaperonas farmacológicas como se ha descrito en otras enfermedades denominadas conformacionales, como la fenilceonuria o la enfermedad de Gaucher (Bernier, et al., 2004; Mu, et al., 2008; Pey, et al., 2008).

En dos de los pacientes que responden a B_{12} se ha identificado la mutación **c.584G>A**. Este cambio que produce el *skipping* del exon 7 del gen MMAB en la línea celular del paciente aunque podría tener niveles discretos de transcritos completos correctamente procesados portadores de la mutación **p.R195Q** y esta podría mantener cierta actividad residual en los pacientes 19244 y 19235 y participar en la respuesta a la vitamina en estos pacientes. Aunque mediante RT-PCR convencional con RNA extraído de fibroblastos no se han conseguido obtener transcritos completos portadores de la mutación puntual, esto sí se ha conseguido utilizando estudio de minigenes en HEK293 ya que existe una expresión diferencial de los distintos factores de *splicing*. Los resultados sugieren que podrían existir transcritos completos en otros tejidos y que quizás la presencia de estos transcritos completos podría explicar como los dos hermanos *chlB* con idéntico genotipo son fenotípicamente muy diferentes. Esto ya se ha descrito en otras enfermedades como la fibrosis quística, donde se ha visto que existe

una correlación inversa entre los niveles de los transcritos completos y la severidad de la enfermedad, sugiriendo un papel esencial del *splicing* como un modificador genético del fenotipo en las enfermedades monogénicas (Nissim-Rafinia and Kerem, 2002; Nissim-Rafinia and Kerem, 2005).

Además del valor diagnóstico, el conocimiento del espectro mutacional en cada población aporta información en cuanto a la relación fenotipo-genotipo que ya hemos ido discutiendo a lo largo de este trabajo. La evolución clínica de los pacientes indica que los pacientes portadores de la mutación p.I96T exhibieron un fenotipo muy diferente; mientras que uno de ellos es clínicamente asintomático los otros fallecieron o tienen una afectación neurológica severa. Estos datos sugieren que los cambios *missense*, p.I96T y p.191W pueden ser mutaciones de plegamiento con pérdida de función usualmente asociadas a inconsistencias en la relación genotipo-fenotipo (Andresen, et al., 1997; Martinez, et al., 2008; Pey, et al., 2003; Pey, et al., 2007). En estos pacientes, otros factores genéticos y epigenéticos deben contribuir a la evolución clínica de los pacientes *cblB*. En este sentido también las diferencias interindividuales en la expresión génica de las proteínas de control de calidad y las proteínas del proteasoma se han descrito como modificadoras del fenotipo en varias enfermedades genéticas humanas (Bross, et al., 1999; Dipple and McCabe, 2000a; Dipple and McCabe, 2000b).

En el caso del paciente perteneciente al grupo de complementación *cblE* se ha identificado una mutación previamente descrita p.V57M (Wilson, et al., 1999) y que previsiblemente es causante de enfermedad. La herencia discordante en esta familia, el paciente es funcionalmente homocigoto y la madre no es portadora de la mutación, hace pensar que este paciente pueda portar bien una delección grande de herencia materna como se ha descrito en otras enfermedades (Desviat, et al., 2006) (Desviat, et al., 2009) o bien que se trate de una disomía uniparental homosómica (Kotzot, 2008). Se están realizando estudios con *arrays* de SNP (Stanczak, et al., 2007) para poder concluir cual es la base genética de la enfermedad en esta familia y así poder ofrecer a la familia un consejo genético adecuado. En estos *arrays* de oligonucleótidos de alta densidad se puede genotipar de forma paralela y estandarizada miles de SNPs en la totalidad del genoma (excepto el cromosoma Y) y así poder encontrar regiones con homocigosidad polimórfica que indiquen la presencia de ambos eventos mutacionales (Koolen, et al., 2009).

En los cinco pacientes MMA genéticamente analizados y pertenecientes al grupo de complementación *mut* se han identificado tres cambios nucleotídicos en una secuencia intrónica. El perfil transcripcional de los pacientes ha revelado que estas mutaciones podrían activar sitios críticos de *splicing* localizados en el interior del intrón 11 y que darían lugar a enfermedad. La secuencia intrónica insertada corresponde a una secuencia con apariencia de exón que estaría insertada en el mRNA maduro y que resulta en un transcrito portador de una mutación PTC que no

mantiene la fase de lectura y es por tanto degradada por el mecanismo NMD. El transcrito *MUT* aberrante con el pseudoexón insertado se ha detectado utilizando un primer específico en líneas celulares de pacientes con mutaciones desestabilizantes en el mRNA y en células control, indicando que se trata de un transcrito raro pero normal, parte del *background* de la maquinaria de *splicing* celular. También se ha sugerido que algunos pseudoexones son auténticos exones cuya inclusión activa el NMD como parte de los eventos de *splicing* alternativo que regulan la expresión génica (Grellscheid and Smith, 2006) (Campeau, et al., 1999).

Los sitios 3' y 5' de *splicing* potenciales con *scores* muy elevados son muy abundantes en secuencias intrónicas aunque por sí solos son insuficientes para asegurar el reconocimiento exónico (Sun and Chasin, 2000). El hecho de que la inclusión de pseudoexones no sea un evento frecuente durante el *splicing* normal se atribuye a defectos en las regiones de *splicing* a pesar del aparente alto valor de las secuencias consenso y al enriquecimiento de silenciadores de *splicing* (Buratti, et al., 2006). Sin embargo, en el pseudoexón descrito en este trabajo, dos mutaciones puntuales diferentes parece que activan la exonización de esta región intrónica haciéndolo altamente parecido a los exones reales.

Aunque parecía que eran infrecuentes, cada vez se reportan más casos de mutaciones intrónicas que activan pseudoexones y causan enfermedad (Davis, et al., 2009; Gurvich, et al., 2008; Pros, et al., 2008). Se ha observado repetidas veces que la prevalencia de este tipo de mutaciones está, probablemente, subestimada, ya que muchas de ellas permanecen sin detectar con las técnicas estándar de detección de mutaciones actuales y, aunque el cDNA se analice, el alelo que porta la inserción suele ser diana de degradación mediante el mecanismo NMD, lo cual hace necesario el uso de inhibidores de este sistema en los cultivos celulares, como ocurre en neurofibromatosis tipo I donde representan aproximadamente un 2% de las mutaciones (Pros, et al., 2009) y en DMD, entre el 4 y el 7% (Gurvich, et al., 2008; Noensie and Dietz, 2001).

Se ha sugerido que la exonización de secuencias intrónicas juega un papel importante en la evolución genética, asociado, en muchos casos a las secuencias repetitivas *Alu*. Se ha visto en numerosos estudios que pueden aparecer fragmentos de secuencias *Alu* en mRNAs maduros y a veces en regiones codificantes (Nekrutenko and Li, 2001; Yulug, et al., 1995). Un ejemplo de esto son las variantes de *splicing* de la glicoproteína biliar que contiene un fragmento *Alu* y que fue identificada mediante análisis por Western inmunoblot (Barnett, et al., 1993). Las secuencias *Alu* contienen sitios de *splicing* potenciales y pueden ser reconocidas como exones y se ha estimado que aproximadamente un 5% de los exones alternativos humanos pueden haber derivado de estas secuencias (Sorek, 2007; Tazi, et al., 2009; Wood, et al., 2007), (Nekrutenko and Li, 2001) (Makalowski, et al., 1994).

Aunque las inserciones de secuencias *Alu* contribuyen a la variabilidad y versatilidad proteica, también en un mRNA maduro puede provocar una enfermedad genética. En el caso del pseudoexón identificado en el gen *MUT*, el software RepeatMasker identificó el pseudoexón como un elemento *Alu* (figura 14). Un cambio de un único nucleótido fue suficiente para causar la exonización de esta secuencia *Alu*, lo cual concuerda con observaciones previas que muestran que la exonización de secuencias *Alu* que deriven en causantes de enfermedad solo requieren de unos pocos cambios. También se ha descrito en el gen que codifica para la 6-piruvil tetrahidrobiopterina sintasa (*PTPS*), una exonización de una secuencia *Alu* por una delección intrónica, poniendo de manifiesto la extraordinaria flexibilidad de las repeticiones *Alu* para asemejarse a las estructuras intrón-exón (Meili, et al., 2009; Knebelmann, et al., 1995; Sorek, et al., 2004; Varon, et al., 2003). Por este motivo, dada la facilidad de que se produzca la exonización de esta secuencia, no podemos descartar la presencia de otros cambios nucleotídicos patológicos o polimorfismos en esta región *Alu* intrónica en otros pacientes con aciduria metilmalónica tipo *mut* y actualmente debe ser incluido su estudio en los análisis genéticos de este gen.

Hasta el momento hemos detectado tres cambios nucleotídicos en la secuencia intrónica insertada (c.1957-892C>A y c.1957-898A>G, c.1957-920A>C) en los cinco pacientes que exonizan la secuencia de 76bp. Las mutaciones puntuales c.1957-892C>A y c.1957-898A>G elevan ligeramente el valor del sitio 5' de *splicing* del pseudoexón y además en el caso de la mutación c.1957-898A>G se aumenta el número de uniones con el snRNAU1 (Roca, et al., 2005). En los dos casos los resultados obtenidos en los experimentos funcionales en modelos celulares de *splicing* con minigenes, sugieren que la inserción es causada por estas mutaciones identificadas en el intrón. Ambas construcciones mutantes resultan en la inserción del pseudoexón, mientras que con la construcción normal se observa una pequeña cantidad de transcrito aberrante con la inserción, como era de esperar, debido a que también se detectan en las líneas celulares de individuos control. De esta forma podemos concluir que el modelo es capaz de mimetizar, en este caso, la situación de la línea celular de fibroblastos de pacientes.

En el caso de la mutación **c.1957-920A>C** aunque los resultados del estudio *in silico* sugieren que afecta al patrón de reconocimiento de la secuencia intrónica por proteínas SR, ya que se observa una ligera bajada en el valor para dos sitios de unión con SRp40 (Cartegni and Krainer, 2003), el análisis funcional utilizando minigenes no demostró de manera clara su relación con la activación del pseudoexón. No podemos descartar que el cambio no contribuya a la inserción aberrante ya que los minigenes no siempre mimetizan la situación *in vivo*, probablemente debido a la falta de secuencias genómicas completas (Svenson, et al., 2001) en el contexto del pseudoexón clonado, como se ha descrito para el exón 37 en el gen *NF1* (Baralle, et al., 2006; Buratti, et al., 2006). No obstante, en fibroblastos de pacientes no se pudo recuperar la actividad

funcional, aunque el transcrito aberrante desapareciera después del tratamiento con AMO, claramente debido a la presencia de otra mutación en el mismo alelo.

El conocimiento de las consecuencias que cada mutación produce en términos de su mecanismo de acción a nivel de DNA y mRNA ha abierto nuevas y prometedoras vías terapéuticas genéticas en estas alteraciones del *splicing*. La modulación del *splicing*, mediante sobreexpresión de factores de *splicing*, uso de drogas (butirato sódico, kinetina, valproico, aclarubicina, benzamidas etc...) (Andreassi, et al., 2001; Hims, et al., 2007; Nissim-Rafinia, et al., 2004), uso de oligonucleótidos antisentido (Takeshima, et al., 2006), etc. permite modificar el perfil de transcritos incorrectamente procesados y por lo tanto alterar la expresión fenotípica. En este trabajo se reporta la aplicabilidad terapéutica de los oligonucleótidos antisentido modificados tipo morfolinos (AMO) a la corrección del *splicing* aberrante en aciduria metilmalónica tipo *mut*, consiguiendo recuperar la actividad en un rango terapéutico. El hecho de que la prevención de inclusión aberrante de pseudoexones mediante el uso de AMOs resulta en la recuperación de la actividad enzimática confirma que la inserción es la causa de enfermedad en estos pacientes.

La corrección del *splicing* en el gen *MUT* mediante AMO fue específica de secuencia, ya que oligómeros diseñados contra otros genes no tienen efecto en ninguna de las líneas celulares MMA tipo *mut* portadores de los cambios intrónicos internos. En todos los casos tras la transfección con AMO específicos de secuencia se han recuperado cerca del 100% de mRNA correctamente procesado en todas las líneas celulares afectadas.

Además, el mRNA correctamente procesado puede ser traducido en cantidades significativas de proteína activa, llegando a los niveles control, como sugieren los resultados, mediante los análisis de incorporación de ^{14}C -propionato como medida indirecta de la actividad mutasa. Para la mutación **c.1957-891C>A**, se obtuvieron diferentes valores de corrección funcional a las 48h que dependían de la concentración de AMO utilizada, llegando a niveles cercanos al control con concentraciones crecientes de AMO. En cuanto a la mutación **c.1957-898A>G**, se obtuvieron diferentes niveles de corrección funcional después del tratamiento con AMO dependiendo de la línea celular utilizada, lo que puede estar relacionado con diferentes niveles de corrección del *splicing* basadas en características genéticas individuales. En cualquier caso, pequeños aumentos en la actividad MCM son suficientes para alcanzar un efecto terapéutico en una enfermedad recesiva, como ha sido descrito en modelos animales modificados con un transgén específico de hígado en otra aciduria orgánica como es la acidemia propiónica (Miyazaki, et al., 2001).

En el caso de las líneas celulares portadoras de la mutación **c.1957-920C>A** no se llegó a obtener una corrección del *splicing* funcional, ni siquiera con la máxima

concentración usada en este trabajo (30 μ M), ni aumentando el tiempo de tratamiento, debido probablemente a que los dos pacientes portadores de esta variante de secuencia portan en *cis* dos cambios nucleotídicos (p.V153D y p.R629G) que han sido postuladas como causantes de enfermedad en estos pacientes. Estos datos, junto a los experimentos funcionales con minigenes sugieren que en estos pacientes el cambio c.1957-920C>A no es la causa de la enfermedad aunque no sabemos si la mutación es o no patogénica por sí misma.

Este estudio muestra que diferentes mutaciones pueden ser una diana efectiva con el mismo AMO para prevenir la inserción del pseudoexón en el mRNA. Hemos observado que la eficiencia de la corrección funcional medida mediante los niveles de incorporación de 14 C-propionato varía entre mutaciones y también entre los fibroblastos de los pacientes con la misma inserción del pseudoexón. Esto puede reflejar sutiles variaciones en el nivel de inserción del pseudoexón debido a diferencias en la fuerza de los sitios aceptor y donador crípticos de *splicing* o a secuencias auxiliares, así como diferencias interindividuales en el *background* genético de algunos genes modificadores como pueden ser factores de *splicing*. Esta variabilidad puede contribuir al fenotipo del paciente, ya que podemos imaginar que existe un pequeño nivel de transcrito normal dependiendo de la mutación intrónica presente, tal y como se ha reportado en otras enfermedades (Gurvich, et al., 2008). Además, estos estudios se han realizado en fibroblastos como la única opción disponible y es posible que los resultados difieran dependiendo del contexto celular.

Hasta la fecha, el tratamiento para la aciduria metilmalónica depende de una dieta restrictiva en proteínas, carnitina y administración de antibióticos, aunque a veces es posible que existan complicaciones a largo plazo (Leonard, 1995). Estos resultados ofrecen una nueva aproximación terapéutica específica de mutación para estas enfermedades que podría ser aplicable a un número mayor de casos ya que las inserciones intrónicas no son detectadas con las técnicas estándar de detección de mutaciones actuales. Así, en las tres líneas celulares de pacientes se alcanzaron actividades residuales próximas a la línea celular control con el tratamiento con AMO. Esto sugiere que en la población de células tratadas la cantidad de proteína funcional sintetizada a partir del mRNA correctamente procesado es suficiente para corregir el defecto enzimático.

Los oligonucleótidos antisentido tipo morfolidos tienen ciertas características que los hacen apropiados para aplicaciones terapéuticas, como la gran especificidad de unión, la resistencia a nucleasas y a la degradación por RNasa H cuando forman híbridos con el RNA (Summerton, 1999). El mayor problema a resolver antes de las aplicaciones clínicas es la vehiculización segura y la determinación de la dosis para cada tejido implicado. Uno de los mayores retos antes del uso práctico de los AMOs en los pacientes de acidurias orgánicas es el transporte eficiente y no tóxico al hígado. En

la distrofia muscular de Duchenne se han inyectado oligonucleótidos antisentido de forma intravenosa en pacientes, llegando a modular el *splicing* hasta restaurar la pauta de lectura para la distrofina (Takeshima, et al., 2006). La eficacia de la terapia antisentido para la corrección del *splicing* debe ser determinada para cada enfermedad y para cada evento deletéreo de *splicing* aunque los resultados reportados hasta ahora predicen una amplia aplicabilidad (Du, et al., 2007; Friedman, et al., 1999; Lacerra, et al., 2000).

Teniendo en cuenta el diseño apropiado para la más alta efectividad, el uso de oligonucleótidos antisentido para modular el *splicing* parece ser más fácil de implementar que la terapia génica, una vez que se haya encontrado una forma de transporte eficiente y se hayan evaluado los efectos a largo plazo (Aartsma-Rus, et al., 2009; Wood, et al., 2007). En nuestro modelo celular, el perfil de expresión génica analizado mediante *microarrays* demostró que el efecto es específico y no se observan cambios en ningún gen después del tratamiento en líneas celulares de fibroblastos. Aunque en células en cultivo los lípidos catiónicos o los polímeros son agentes de transporte eficientes, su gran tamaño y/o toxicidad excluye su utilización *in vivo*. Estrategias de transporte basadas en dendrímeros, como la utilizada en estos experimentos (Vivo-Morfolinos) puede ser la opción para futuros análisis (Bermejo, et al., 2007; Yoo and Juliano, 2000). En este trabajo aunque no hemos conseguido disminuir los niveles de ROS si hemos visto que los dendrímeros utilizados parecen menos tóxicos para la célula que los transportadores peptídicos como el EndoPorter. En cualquier caso, en MMA, el desarrollo de un modelo animal para esta enfermedad, idealmente un *knock-in* para mutaciones que activen un pseudoexón sería el siguiente paso en la investigación de la corrección de aberraciones de *splicing* mediante el tratamiento con AMOs. Recientes avances en este campo incluyen la restauración de la expresión de la distrofina mediante un sistema de transporte sistémico de Vivo-Morfolinos en el ratón *mdx* (Wu, et al., 2009). En otro contexto, un modelo en pez zebra de la enfermedad de Menkes se ha utilizado también para explorar el rescate del *splicing* aberrante con oligonucleótidos antisentido (Madsen, et al., 2008), confirmando la viabilidad *in vivo* de esta estrategia terapéutica. Hasta la fecha, los estudios en modelos animales y los ensayos clínicos en humanos son prometedores, mostrando biodisponibilidad funcional y estabilidad en varios órganos diana y un buen perfil de seguridad (Takeshima, et al., 2006; van Deutekom, et al., 2007).

En resumen, los resultados presentados en este trabajo tienen un claro valor diagnóstico además de un valor terapéutico añadido. Hemos demostrado como la caracterización del perfil mutacional de los pacientes con aciduria metilmalónica aislada tipo *cblA* y *cblB* ha aportando valiosos resultados para la investigación en nuevas terapias farmacológicas, drogas *read-through* o chaperonas farmacológicas en el contexto de mutaciones específicas. En el caso de los pacientes MMA tipo *mut* la identificación de la secuencia intrónica interna tipo *Alu*, donde hemos detectado dos

cambios causantes de enfermedad, ha elevado el porcentaje de detección de mutaciones en este gen a cerca del 100% y no sería sorprendente que aparecieran nuevos cambios aunque estos deberán ser analizados funcionalmente utilizando el modelo celular de *splicing* que hemos descrito. Además, los resultados que se presentan demuestran que la exonización de secuencias intrónicas puede ser corregida *in vitro* utilizando oligonucleótidos antisentido lo que sienta las bases para la investigación en una terapia antisentido en MMAuria y otras enfermedades genéticas humanas en el contexto de este tipo de mutaciones.

6. CONCLUSIONES

1. El estudio genético de pacientes con **aciduria metilmalónica aislada tipo *cbIA*** ha revelado la existencia de numerosas mutaciones que provocan codones de parada prematuros (PTC), identificándose 7 cromosomas mutantes portadores de mutaciones *nonsense*. A pesar de que los pacientes MMA tipo *cbIA* presentan mutaciones *a priori* severas en ambos alelos, los pacientes presentan un fenotipo más benigno que los pacientes *cbIB* o *mut*, con una respuesta positiva *in vivo* e *in vitro* a vitamina B₁₂.
2. Los estudios de expresión génica específicos del gen *MMAA* realizados en líneas de fibroblastos de los pacientes sugieren que los mRNA portadores de mutaciones PTC en este gen, evaden el sistema de vigilancia de mRNA o *nonsense-mediated decay*. Sin embargo, no es un fenómeno aplicable al gen *MUT*, donde los mRNA portadores de mutaciones PTC son degradados mientras no ocurre así con los mRNA portadores de mutaciones de cambio de aminoácido.
3. El elevado número de mutaciones *nonsense* junto al fenómeno de evasión del NMD hace que los pacientes con aciduria metilmalónica tipo *cbIA* puedan ser tratados con drogas *read-through* y en la actualidad constituye la base científica para poder ser incluidos en un ensayo clínico con el fármaco Ataluren®. Los pacientes pertenecientes al grupo de complemeatación *mut* y con mutaciones PTC también pueden ser incluidos, aunque previamente deberá ser inhibido el sistema NMD para aumentar los niveles de transcritos portadores de PTC en fase.
4. Los estudios genéticos y la relación con el fenotipo bioquímico en **aciduria metilmalónica tipo *cbIB***, han permitido identificar 4 mutaciones severas (R186W, c.291-1G>A, c.290G>A y IVS4-1G>C) que estarían asociadas a una ausencia de respuesta *in vitro* a B₁₂, mientras que se han identificado dos mutaciones *missense* (p.I96T y p.R191W), posiblemente estructurales, que podrían retener actividad residual *in vivo* y ser las responsables de la respuesta a B₁₂. Estos resultados sugieren que deberían realizarse ensayos *in vitro* para identificar chaperonas farmacológicas o activadores transcripcionales con posibilidades terapéuticas aplicables a la clínica.
5. Se ha identificado una secuencia *Alu* en el interior del intrón 11 del gen *MUT* con características de pseudoexon, donde se han detectado tres variantes de secuencia diferentes (c.1957-891C>A, c.1957-898A>G y c.1957-920C>A). Estos resultados sugieren que es una región de hipermutabilidad y que debe ser incluida en los estudios genéticos de pacientes MMA tipo *mut*, con el propósito de alcanzar el 100% de detección mutacional en este gen.
6. Se ha demostrado mediante estudios del perfil transcripcional de las líneas celulares de los pacientes y mediante estudios funcionales de los tres cambios nucleotídicos en modelos celulares de *splicing*, que las mutaciones c.1957-891C>A y c.1957-898A>G podrían ser la causa de la exonización de la secuencia de 76 pares de base del intrón 11. Los resultados del estudio de la mutación c.1957-920C>A sugieren que es una variante rara sin clara afectación clínica.
7. Los resultados de transfección con oligonucleótidos antisentido tipo morfolidos han demostrado la recuperación de la actividad de la metilmalonil-CoA mutasa en las tres líneas celulares de pacientes portadores de las mutaciones c.1957-891C>A y c.1957-898A>G a niveles próximos al control. Estos resultados sugieren que la inserción de 76 bp es la causa de la enfermedad en estos pacientes.

8. Todos estos resultados sugieren que la terapia antisentido puede ser clínicamente prometedora en aciduria metilmalónica y en otras enfermedades genéticas humanas, en el contexto de este tipo de mutaciones, que han permanecido hasta ahora sin identificar mediante las técnicas estándar de genotipado.

9. Este trabajo es un claro ejemplo de cómo los estudios de las bases moleculares de las enfermedades genéticas humanas y el conocimiento de los mecanismos de acción de las variantes alélicas aportan una base científica para la aplicación e investigación de nuevas dianas terapéuticas, y demuestran que el estudio molecular además de tener un valor diagnóstico tiene un valor terapéutico añadido.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aartsma-Rus A, van Ommen GJ. 2007. Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *Rna* 13(10):1609-24.
- Aartsma-Rus A, van Vliet L, Hirschi M, Janson AA, Heemskerk H, de Winter CL, de Kimpe S, van Deutekom JC, t Hoen PA, van Ommen GJ. 2009. Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms. *Mol Ther* 17(3):548-53.
- Acquaviva C, Benoist JF, Pereira S, Callebaut I, Koskas T, Porquet D, Elion J. 2005. Molecular basis of methylmalonyl-CoA mutase apoenzyme defect in 40 European patients affected by mut(o) and mut- forms of methylmalonic acidemia: identification of 29 novel mutations in the MUT gene. *Hum Mutat* 25(2):167-76.
- Agrawal S, Kandimalla ER. 2000. Antisense therapeutics: is it as simple as complementary base recognition? *Mol Med Today* 6(2):72-81.
- Ames BN, Elson-Schwab I, Silver EA. 2002. High-dose vitamin therapy stimulates variant enzymes with decreased coenzyme binding affinity (increased K(m)): relevance to genetic disease and polymorphisms. *Am J Clin Nutr* 75(4):616-58.
- Andreassi C, Jarecki J, Zhou J, Coover DD, Monani UR, Chen X, Whitney M, Pollok B, Zhang M, Androphy E and others. 2001. Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum Mol Genet* 10(24):2841-9.
- Andresen BS, Bross P, Udvari S, Kirk J, Gray G, Kmoch S, Chamois N, Knudsen I, Winter V, Wilcken B and others. 1997. The molecular basis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in compound heterozygous patients: is there correlation between genotype and phenotype? *Hum Mol Genet* 6(5):695-707.
- Andresen BS, Dobrowolski SF, O'Reilly L, Muenzer J, McCandless SE, Frazier DM, Udvari S, Bross P, Knudsen I, Banas R and others. 2001. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) mutations identified by MS/MS-based prospective screening of newborns differ from those observed in patients with clinical symptoms: identification and characterization of a new, prevalent mutation that results in mild MCAD deficiency. *Am J Hum Genet* 68(6):1408-18.
- Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN. 2000. Disease-causing mutations in the human genome. *Eur J Pediatr* 159 Suppl 3:S173-8.
- Auld DS, Thorne N, Maguire WF, Inglese J. 2009. Mechanism of PTC124 activity in cell-based luciferase assays of nonsense codon suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9):3585-90.
- Banerjee R. 2006. B12 trafficking in mammals: A for coenzyme escort service. *ACS Chem Biol* 1(3):149-59.
- Baralle M, Skoko N, Knezevich A, De Conti L, Motti D, Bhuvanagiri M, Baralle D, Buratti E, Baralle FE. 2006. NF1 mRNA biogenesis: effect of the genomic milieu in splicing regulation of the NF1 exon 37 region. *FEBS Lett* 580(18):4449-56.
- Barnett TR, Drake L, Pickle W, 2nd. 1993. Human biliary glycoprotein gene: characterization of a family of novel alternatively spliced RNAs and their expressed proteins. *Mol Cell Biol* 13(2):1273-82.
- Bermejo JF, Ortega P, Chonco L, Eritja R, Samaniego R, Mullner M, de Jesus E, de la Mata FJ, Flores JC, Gomez R and others. 2007. Water-soluble carbosilane

- dendrimers: synthesis biocompatibility and complexation with oligonucleotides; evaluation for medical applications. *Chemistry* 13(2):483-95.
- Bernier V, Lagace M, Bichet DG, Bouvier M. 2004. Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol Metab* 15(5):222-8.
- Blencowe BJ. 2000. Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci* 25(3):106-10.
- Bourgeois CF, Lejeune F, Stevenin J. 2004. Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 78:37-88.
- Bross P, Corydon TJ, Andresen BS, Jorgensen MM, Bolund L, Gregersen N. 1999. Protein misfolding and degradation in genetic diseases. *Hum Mutat* 14(3):186-98.
- Buck NE, Wood L, Hu R, Peters HL. 2009. Stop codon read-through of a Methylmalonic aciduria mutation. *Mol Genet Metab* 97(4):244-9.
- Buckler AJ, Chang DD, Graw SL, Brook JD, Haber DA, Sharp PA, Housman DE. 1991. Exon amplification: a strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(9):4005-9.
- Buratti E, Baralle M, Baralle FE. 2006. Defective splicing, disease and therapy: searching for master checkpoints in exon definition. *Nucleic Acids Res* 34(12):3494-510.
- Campeau E, Dupuis L, Leclerc D, Gravel RA. 1999. Detection of a normally rare transcript in propionic acidemia patients with mRNA destabilizing mutations in the PCCA gene. *Hum Mol Genet* 8:107-113.
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3(4):285-98.
- Cartegni L, Krainer AR. 2003. Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat Struct Biol* 10(2):120-5.
- Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. 2003. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31(13):3568-71.
- Clavero S, Perez B, Rincon A, Ugarte M, Desviat LR. 2004. Qualitative and quantitative analysis of the effect of splicing mutations in propionic acidemia underlying non-severe phenotypes. *Hum Genet* 115(3):239-47.
- Coelho D, Suormala T, Stucki M, Lerner-Ellis JP, Rosenblatt DS, Newbold RF, Baumgartner MR, Fowler B. 2008. Gene identification for the cblD defect of vitamin B12 metabolism. *N Engl J Med* 358(14):1454-64.
- Cohen FE, Kelly JW. 2003. Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* 426(6968):905-9.
- Cooper DN, Stenson PD, Chuzhanova NA. 2006. The Human Gene Mutation Database (HGMD) and its exploitation in the study of mutational mechanisms. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 1:Unit 1* 13.
- Cooper TA. 2005. Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods* 37(4):331-40.
- Cotton RG, Sriver CR. 1998. Proof of "disease causing" mutation. *Hum Mutat* 12(1):1-3.
- Coulombe JT, Shih VE, Levy HL. 1981. Massachusetts Metabolic Disorders Screening Program. II. Methylmalonic aciduria. *Pediatrics* 67(1):26-31.
- Coutinho G, Xie J, Du L, Brusco A, Krainer AR, Gatti RA. 2005. Functional significance of a deep intronic mutation in the ATM gene and evidence for an alternative exon 28a. *Hum Mutat* 25(2):118-24.

- Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF. 2007. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 76:51-74.
- Dantas MF, Suormala T, Randolph A, Coelho D, Fowler B, Valle D, Baumgartner MR. 2005. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: mutation analysis in 28 probands, 9 symptomatic and 19 detected by newborn screening. *Hum Mutat* 26(2):164.
- Davis RL, Homer VM, George PM, Brennan SO. 2009. A deep intronic mutation in FGB creates a consensus exonic splicing enhancer motif that results in afibrinogenemia caused by aberrant mRNA splicing, which can be corrected in vitro with antisense oligonucleotide treatment. *Hum Mutat* 30(2):221-7.
- Desviat LR, Perez B, Gamez A, Sanchez A, Garcia MJ, Martinez-Pardo M, Marchante C, Boveda D, Baldellou A, Arena J and others. 1999. Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *Eur J Hum Genet* 7(3):386-92.
- Desviat LR, Perez B, Ugarte M. 2003. Investigation of folding and degradation of in vitro synthesized mutant proteins in the cytosol. *Methods Mol Biol* 232:257-63.
- Desviat LR, Perez B, Ugarte M. 2006. Identification of exonic deletions in the PAH gene causing phenylketonuria by MLPA analysis. *Clin Chim Acta* 373(1-2):164-7.
- Desviat LR, Sanchez-Alcudia R, Perez B, Perez-Cerda C, Navarrete R, Vijzelaar R, Ugarte M. 2009. High frequency of large genomic deletions in the PCCA gene causing propionic acidemia. *Mol Genet Metab* 96(4):171-6.
- Dipple KM, McCabe ER. 2000a. Modifier genes convert "simple" Mendelian disorders to complex traits. *Mol Genet Metab* 71(1-2):43-50.
- Dipple KM, McCabe ER. 2000b. Phenotypes of patients with "simple" Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics. *Am J Hum Genet* 66(6):1729-35.
- Dobson CM, Wai T, Leclerc D, Kadir H, Narang M, Lerner-Ellis JP, Hudson TJ, Rosenblatt DS, Gravel RA. 2002a. Identification of the gene responsible for the cblB complementation group of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria. *Hum Mol Genet* 11(26):3361-9.
- Dobson CM, Wai T, Leclerc D, Wilson A, Wu X, Dore C, Hudson T, Rosenblatt DS, Gravel RA. 2002b. Identification of the gene responsible for the cblA complementation group of vitamin B12-responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24):15554-9.
- Du L, Pollard JM, Gatti RA. 2007. Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(14):6007-12.
- Du M, Liu X, Welch EM, Hirawat S, Peltz SW, Bedwell DM. 2008. PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6):2064-9.
- Ellingsen S, Knappskog PM, Apold J, Eiken HG. 1999. Diverse PAH transcripts in lymphocytes of PKU patients with putative nonsense (G272X, Y356X) and missense (P281L, R408Q) mutations. *FEBS Lett* 457(3):505-8.
- Ensenauer R, Vockley J, Willard JM, Huey JC, Sass JO, Edland SD, Burton BK, Berry SA, Santer R, Grunert S and others. 2004. A common mutation is associated with a mild, potentially asymptomatic phenotype in patients with isovaleric acidemia diagnosed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 75(6):1136-42.

- Erlandsen H, Pey AL, Gamez A, Perez B, Desviat LR, Aguado C, Koch R, Surendran S, Tying S, Matalon R and others. 2004. Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(48):16903-8.
- Fan C, Bobik TA. 2008. Functional characterization and mutation analysis of human ATP:Cob(I)alamin adenosyltransferase. *Biochemistry* 47(9):2806-13.
- Faustino NA, Cooper TA. 2003. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 17(4):419-37.
- Fenton WA, Gravel RA, Rosenberg LE. 2001. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly W, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill. p 2165-2190.
- Fenton WA, Rosenberg LE. 1981. The defect in the cbl B class of human methylmalonic acidemia: deficiency of cob(I)alamin adenosyltransferase activity in extracts of cultured fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 98(1):283-9.
- Fowler B, Leonard JV, Baumgartner MR. 2008. Causes of and diagnostic approach to methylmalonic acidurias. *J Inherit Metab Dis* 31(3):350-60.
- Francalanci F, Davis NK, Fuller JQ, Murfitt D, Leadlay PF. 1986. The subunit structure of methylmalonyl-CoA mutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem J* 236(2):489-94.
- Friedman KJ, Kole J, Cohn JA, Knowles MR, Silverman LM, Kole R. 1999. Correction of aberrant splicing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 274(51):36193-9.
- Gregersen N, Bross P, Andresen BS. 2004. Genetic defects in fatty acid beta-oxidation and acyl-CoA dehydrogenases. Molecular pathogenesis and genotype-phenotype relationships. *Eur J Biochem* 271(3):470-82.
- Gregersen N, Bross P, Andresen BS, Pedersen PL, Corydon MJ, Bolund L. 2001. The role of chaperone-assisted folding and quality control in inborn errors of metabolism: protein folding disorders. *J Inherit Metab Dis* 24:189-212.
- Gregersen N, Bross P, Jorgensen MM, Corydon TJ, Andresen BS. 2000. Defective folding and rapid degradation of mutant proteins is a common disease mechanism in genetic disorders. *J Inherit Metab Dis* 23(5):441-7.
- Grellscheid SN, Smith CW. 2006. An apparent pseudo-exon acts both as an alternative exon that leads to nonsense-mediated decay and as a zero-length exon. *Mol Cell Biol* 26(6):2237-46.
- Gulati S, Brody LC, Banerjee R. 1999. Posttranscriptional regulation of mammalian methionine synthase by B12. *Biochem Biophys Res Commun* 259(2):436-42.
- Gurvich OL, Tuohy TM, Howard MT, Finkel RS, Medne L, Anderson CB, Weiss RB, Wilton SD, Flanigan KM. 2008. DMD pseudoexon mutations: splicing efficiency, phenotype, and potential therapy. *Ann Neurol* 63(1):81-9.
- Hims MM, Ibrahim EC, Leyne M, Mull J, Liu L, Lazaro C, Shetty RS, Gill S, Gusella JF, Reed R and others. 2007. Therapeutic potential and mechanism of kinetin as a treatment for the human splicing disease familial dysautonomia. *J Mol Med* 85(2):149-61.
- Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE. 2004. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 36(8):801-8.
- Horster F, Baumgartner MR, Viardot C, Suormala T, Burgard P, Fowler B, Hoffmann GF, Garbade SF, Kolker S, Baumgartner ER. 2007. Long-term outcome in methylmalonic acidurias is influenced by the underlying defect (mut0, mut-, cblA, cblB). *Pediatr Res* 62(2):225-30.

- Hu R, Buck NE, Khaniani MS, Wood L, Wardan H, Benoist JF, Li L, Vadolas J, Sarsero JP, Ioannou PA and others. 2009. Gene induction for the treatment of methylmalonic aciduria. *J Gene Med* 11(4):361-9.
- Isken O, Maquat LE. 2007. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* 21(15):1833-56.
- Jansen R, Kalousek F, Fenton WA, Rosenberg LE, Ledley FD. 1989. Cloning of full-length methylmalonyl-CoA mutase from a cDNA library using the polymerase chain reaction. *Genomics* 4(2):198-205.
- John SWM, Weitzner G, Rozen R, Sriver CR. 1991. A Rapid Procedure for Extracting Genomic DNA from Leukocytes. *Nucl. Acids Res.* 19(2):408.
- Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, Toraya T. 2001. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem* 276(39):36514-9.
- Kerem E, Hirawat S, Armoni S, Yaakov Y, Shoseyov D, Cohen M, Nissim-Rafinia M, Blau H, Rivlin J, Aviram M and others. 2008. Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet* 372(9640):719-27.
- Kerr TP, Sewry CA, Robb SA, Roberts RG. 2001. Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum Genet* 109(4):402-7.
- Khajavi M, Inoue K, Lupski JR. 2006. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur J Hum Genet* 14(10):1074-81.
- Knebelmann B, Forestier L, Drouot L, Quinones S, Chuet C, Benessy F, Saus J, Antignac C. 1995. Splice-mediated insertion of an Alu sequence in the COL4A3 mRNA causing autosomal recessive Alport syndrome. *Hum Mol Genet* 4(4):675-9.
- Kolhouse JF, Utley C, Fenton WA, Rosenberg LE. 1981. Immunochemical studies on cultured fibroblasts from patients with inherited methylmalonic acidemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12):7737-41.
- Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Scheltinga I, Siermans E, Smeets D, Brunner HG and others. 2009. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat* 30(3):283-92.
- Korotkova N, Lidstrom ME. 2004. MeaB is a component of the methylmalonyl-CoA mutase complex required for protection of the enzyme from inactivation. *J Biol Chem* 279(14):13652-8.
- Kotzot D. 2008. Complex and segmental uniparental disomy updated. *J Med Genet* 45(9):545-56.
- Kozak M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44(2):283-92.
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. 1992. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90(1-2):41-54.
- Kurreck J. 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 270(8):1628-44.
- Kuzmiak HA, Maquat LE. 2006. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med* 12(7):306-16.
- Lacerra G, Sierakowska H, Carestia C, Fucharoen S, Summerton J, Weller D, Kole R. 2000. Restoration of hemoglobin A synthesis in erythroid cells from peripheral blood of thalassemic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17):9591-6.

- Lai CH, Chun HH, Nahas SA, Mitui M, Gamo KM, Du L, Gatti RA. 2004. Correction of ATM gene function by aminoglycoside-induced read-through of premature termination codons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(44):15676-81.
- Leal NA, Park SD, Kima PE, Bobik TA. 2003. Identification of the human and bovine ATP:Cob(I)alamin adenosyltransferase cDNAs based on complementation of a bacterial mutant. *J Biol Chem* 278(11):9227-34.
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5(2):227-31.
- Ledley FD, Crane AM, Lumetta M. 1990. Heterogeneous alleles and expression of methylmalonyl CoA mutase in mut methylmalonic acidemia. *Am J Hum Genet* 46(3):539-47.
- Ledley FD, Lumetta MR, Zoghbi HY, VanTuinen P, Ledbetter SA, Ledbetter DH. 1988. Mapping of human methylmalonyl CoA mutase (MUT) locus on chromosome 6. *Am J Hum Genet* 42(6):839-46.
- Lempp TJ, Suormala T, Siegenthaler R, Baumgartner ER, Fowler B, Steinmann B, Baumgartner MR. 2007. Mutation and biochemical analysis of 19 probands with mut0 and 13 with mut- methylmalonic aciduria: identification of seven novel mutations. *Mol Genet Metab* 90(3):284-90.
- Leonard JV. 1995. The management and outcome of propionic and methylmalonic acidemia. *J Inher Metab Dis* 18(4):430-4.
- Lerner-Ellis JP, Anastasio N, Liu J, Coelho D, Suormala T, Stucki M, Loewy AD, Gurd S, Grundberg E, Morel CF and others. 2009. Spectrum of mutations in MMACHC, allelic expression, and evidence for genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat*.
- Lerner-Ellis JP, Dobson CM, Wai T, Watkins D, Tirone JC, Leclerc D, Dore C, Lepage P, Gravel RA, Rosenblatt DS. 2004. Mutations in the MMAA gene in patients with the cblA disorder of vitamin B12 metabolism. *Hum Mutat* 24(6):509-16.
- Lerner-Ellis JP, Gradinger AB, Watkins D, Tirone JC, Villeneuve A, Dobson CM, Montpetit A, Lepage P, Gravel RA, Rosenblatt DS. 2006. Mutation and biochemical analysis of patients belonging to the cblB complementation class of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria. *Mol Genet Metab* 87(3):219-25.
- Li YF, Morcos PA. 2008. Design and synthesis of dendritic molecular transporter that achieves efficient in vivo delivery of morpholino antisense oligo. *Bioconjug Chem* 19(7):1464-70.
- Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, Oren YS, Wilschanski M, Yaacov Y, Virgilis D, Neu-Yilik G, Kulozik AE, Kerem E and others. 2007. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest* 117(3):683-92.
- Linde L, Kerem B. 2008. Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet* 24(11):552-63.
- Linscheid P, Schaffner A, Schoedon G. 1998. Modulation of inducible nitric oxide synthase mRNA stability by tetrahydrobiopterin in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 243(1):137-41.
- Madsen EC, Morcos PA, Mendelsohn BA, Gitlin JD. 2008. In vivo correction of a Menkes disease model using antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(10):3909-14.
- Makalowski W, Mitchell GA, Labuda D. 1994. Alu sequences in the coding regions of mRNA: a source of protein variability. *Trends Genet* 10(6):188-93.

- Mancia F, Evans PR. 1998. Conformational changes on substrate binding to methylmalonyl CoA mutase and new insights into the free radical mechanism. *Structure* 6(6):711-20.
- Mancia F, Keep NH, Nakagawa A, Leadlay PF, McSweeney S, Rasmussen B, Bosecke P, Diat O, Evans PR. 1996. How coenzyme B₁₂ radicals are generated: the crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution. *Structure* 4(3):339-50.
- Maquat LE. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2):89-99.
- Maquat LE. 2005. Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci* 118(Pt 9):1773-6.
- Martinez A, Calvo AC, Teigen K, Pey AL. 2008. Rescuing proteins of low kinetic stability by chaperones and natural ligands phenylketonuria, a case study. *Prog Mol Biol Transl Sci* 83:89-134.
- Matsui SM, Mahoney MJ, Rosenberg LE. 1983. The natural history of the inherited methylmalonic acidemias. *N Engl J Med* 308(15):857-61.
- Meili D, Kralovicova J, Zagalak J, Bonafe L, Fiori L, Blau N, Thony B, Vorechovsky I. 2009. Disease-causing mutations improving the branch site and polypyrimidine tract: pseudoexon activation of LINE-2 and antisense Alu lacking the poly(T)-tail. *Hum Mutat* 30(5):823-31.
- Metherell LA, Akker SA, Munroe PB, Rose SJ, Caulfield M, Savage MO, Chew SL, Clark AJ. 2001. Pseudoexon activation as a novel mechanism for disease resulting in atypical growth-hormone insensitivity. *Am J Hum Genet* 69(3):641-6.
- Miyazaki T, Ohura T, Kobayashi M, Shigematsu Y, Yamaguchi S, Suzuki Y, Hata I, Aoki Y, Yang X, Minjares C and others. 2001. Fatal propionic acidemia in mice lacking propionyl-CoA carboxylase and its rescue by postnatal, liver-specific supplementation via a transgene. *J Biol Chem* 276(38):35995-9.
- Morcos PA. 2007. Achieving targeted and quantifiable alteration of mRNA splicing with Morpholino oligos. *Biochem Biophys Res Commun* 358(2):521-7.
- Morrow G, 3rd, Mahoney MJ, Mathews C, Lebowitz J. 1975. Studies of methylmalonyl coenzyme A carboxylase activity in methylmalonic acidemia. I. Correlation of clinical, hepatic, and fibroblast data. *Pediatr Res* 9(8):641-4.
- Mort M, Ivanov D, Cooper DN, Chuzhanova NA. 2008. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum Mutat* 29(8):1037-47.
- Mu TW, Ong DS, Wang YJ, Balch WE, Yates JR, 3rd, Segatori L, Kelly JW. 2008. Chemical and biological approaches synergize to ameliorate protein-folding diseases. *Cell* 134(5):769-81.
- Murphy C, Murray AM, Meaney S, Gafvels M. 2007. Regulation by SREBP-2 defines a potential link between isoprenoid and adenosylcobalamin metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 355(2):359-64.
- Nekrutenko A, Li WH. 2001. Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. *Trends Genet* 17(11):619-21.
- Nham SU, Wilkemeyer MF, Ledley FD. 1990. Structure of the human methylmalonyl-CoA mutase (MUT) locus. *Genomics* 8(4):710-6.
- Nielsen KB, Sorensen S, Cartegni L, Corydon TJ, Doktor TK, Schroeder LD, Reinert LS, Elpeleg O, Krainer AR, Gregersen N and others. 2007. Seemingly neutral polymorphic variants may confer immunity to splicing-inactivating mutations: a synonymous SNP in exon 5 of MCAD protects from deleterious mutations in a flanking exonic splicing enhancer. *Am J Hum Genet* 80(3):416-32.

- Nissim-Rafinia M, Aviram M, Randell SH, Shushi L, Ozeri E, Chiba-Falek O, Eidelman O, Pollard HB, Yankaskas JR, Kerem B. 2004. Restoration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function by splicing modulation. *EMBO Rep* 5(11):1071-7.
- Nissim-Rafinia M, Kerem B. 2002. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet* 18(3):123-7.
- Nissim-Rafinia M, Kerem B. 2005. The splicing machinery is a genetic modifier of disease severity. *Trends Genet* 21(9):480-3.
- Noensie EN, Dietz HC. 2001. A strategy for disease gene identification through nonsense-mediated mRNA decay inhibition. *Nat Biotechnol* 19(5):434-9.
- Nyhan WL, Fawcett N, Ando T, Rennert OM, Julius RL. 1973. Response to dietary therapy in B 12 unresponsive methylmalonic acidemia. *Pediatrics* 51(3):539-48.
- Ogasawara M, Matsubara Y, Mikami H, Narisawa K. 1994. Identification of two novel mutations in the methylmalonyl-CoA mutase gene with decreased levels of mutant mRNA in methylmalonic acidemia. *Hum Mol Genet* 3(6):867-72.
- Oltean S, Banerjee R. 2003. Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B12. *J Biol Chem* 278(23):20778-84.
- Padovani D, Banerjee R. 2006. Assembly and protection of the radical enzyme, methylmalonyl-CoA mutase, by its chaperone. *Biochemistry* 45(30):9300-6.
- Pagani F, Baralle FE. 2004. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet* 5(5):389-96.
- Pagani F, Buratti E, Stuani C, Baralle FE. 2003. Missense, nonsense, and neutral mutations define juxtaposed regulatory elements of splicing in cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9. *J Biol Chem* 278(29):26580-8.
- Perez-Cerda C, Merinero B, Sanz P, Jimenez A, Garcia MJ, Urbon A, Diaz Recasens J, Ramos C, Ayuso C, Ugarte M. 1989. Successful first trimester diagnosis in a pregnancy at risk for propionic acidemia. *J Inher Metab Dis* 12 Suppl 2:274-6.
- Pey AL, Desviat LR, Gamez A, Ugarte M, Perez B. 2003. Phenylketonuria: Genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Hum Mutat* 21(4):370-8.
- Pey AL, Perez B, Desviat LR, Martinez MA, Aguado C, Erlandsen H, Gamez A, Stevens RC, Thorolfsson M, Ugarte M and others. 2004. Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Hum Mutat* 24(5):388-99.
- Pey AL, Stricher F, Serrano L, Martinez A. 2007. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. *Am J Hum Genet* 81(5):1006-24.
- Pey AL, Ying M, Cremades N, Velazquez-Campoy A, Scherer T, Thony B, Sancho J, Martinez A. 2008. Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *J Clin Invest* 118(8):2858-67.
- Pozzoli U, Sironi M. 2005. Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol Life Sci* 62(14):1579-604.
- Pros E, Fernandez-Rodriguez J, Canet B, Benito L, Sanchez A, Benavides A, Ramos FJ, Lopez-Ariztegui MA, Capella G, Blanco I and others. 2009. Antisense therapeutics for neurofibromatosis type 1 caused by deep intronic mutations. *Hum Mutat* 30(3):454-62.
- Pros E, Gomez C, Martin T, Fabregas P, Serra E, Lazaro C. 2008. Nature and mRNA effect of 282 different NF1 point mutations: focus on splicing alterations. *Hum Mutat* 29(9):E173-E193.

- Richard E, Alvarez-Barrientos A, Perez B, Desviat LR, Ugarte M. 2007. Methylmalonic acidemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway. *J Pathol* 213(4):453-61.
- Richard E, Desviat LR, Perez B, Perez-Cerda C, Ugarte M. 1999. Genetic heterogeneity in propionic acidemia patients with alpha-subunit defects. Identification of five novel mutations, one of them causing instability of the protein. *Biochim Biophys Acta* 1453(3):351-8.
- Rincon A, Aguado C, Desviat LR, Sanchez-Alcudia R, Ugarte M, Perez B. 2007. Propionic and Methylmalonic Acidemia: Antisense Therapeutics for Intronic Variations Causing Aberrantly Spliced Messenger RNA. *Am J Hum Genet* 81(6).
- Roca X, Sachidanandam R, Krainer AR. 2005. Determinants of the inherent strength of human 5' splice sites. *Rna* 11(5):683-98.
- Rosenblatt DS, Wayne, A.F. 2001. Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D, editor. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*. New York: McGrall-Hill. p 3897-3933.
- Saridakis V, Yakunin A, Xu X, Anandakumar P, Pennycooke M, Gu J, Cheung F, Lew JM, Sanishvili R, Joachimiak A and others. 2004. The structural basis for methylmalonic aciduria. The crystal structure of archaeal ATP:cobalamin adenosyltransferase. *J Biol Chem* 279(22):23646-53.
- Satoh T, Narisawa K, Igarashi Y, Saitoh T, Hayasaka K, Ichinohazama Y, Onodera H, Tada K, Oohara K. 1981. Dietary therapy in two patients with vitamin B12-unresponsive methylmalonic acidemia. *Eur J Pediatr* 135(3):305-12.
- Scriver CR, Waters PJ. 1999. Monogenic traits are not simple: lessons from Phenylketonuria. *Trends Genet.* 15(7):267-272.
- Schubert HL, Hill CP. 2006. Structure of ATP-Bound Human ATP:Cobalamin Adenosyltransferase. *Biochemistry* 45(51):15188-96.
- Sironi M, Menozzi G, Riva L, Cagliani R, Comi GP, Bresolin N, Giorda R, Pozzoli U. 2004. Silencer elements as possible inhibitors of pseudoexon splicing. *Nucleic Acids Res* 32(5):1783-91.
- Skandalis A, Uribe E. 2004. A survey of splice variants of the human hypoxanthine phosphoribosyl transferase and DNA polymerase beta genes: products of alternative or aberrant splicing? *Nucleic Acids Res* 32(22):6557-64.
- Sorek R. 2007. The birth of new exons: mechanisms and evolutionary consequences. *Rna* 13(10):1603-8.
- Sorek R, Lev-Maor G, Reznik M, Dagan T, Belinky F, Graur D, Ast G. 2004. Minimal conditions for exonization of intronic sequences: 5' splice site formation in alu exons. *Mol Cell* 14(2):221-31.
- Stanczak CM, Chen Z, Zhang YH, Nelson SF, McCabe ER. 2007. Deletion mapping in Xp21 for patients with complex glycerol kinase deficiency using SNP mapping arrays. *Hum Mutat* 28(3):235-42.
- Summerton J. 1999. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta* 1489(1):141-58.
- Sun H, Chasin LA. 2000. Multiple splicing defects in an intronic false exon. *Mol Cell Biol* 20(17):6414-25.
- Suwanmanee T, Sierakowska H, Fucharoen S, Kole R. 2002. Repair of a splicing defect in erythroid cells from patients with beta-thalassemia/HbE disorder. *Mol Ther* 6(6):718-26.

- Svenson IK, Ashley-Koch AE, Pericak-Vance MA, Marchuk DA. 2001. A second leaky splice-site mutation in the spastin gene. *Am J Hum Genet* 69(6):1407-9.
- Takeshima Y, Yagi M, Wada H, Ishibashi K, Nishiyama A, Kakumoto M, Sakaeda T, Saura R, Okumura K, Matsuo M. 2006. Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 59(5):690-4.
- Tazi J, Bakkour N, Stamm S. 2009. Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta* 1792(1):14-26.
- Thoma NH, Leadlay PF. 1996. Homology modeling of human methylmalonyl-CoA mutase: a structural basis for point mutations causing methylmalonic aciduria. *Protein Sci* 5(9):1922-7.
- Tuffery-Giraud S, Saquet C, Chambert S, Claustres M. 2003. Pseudoexon activation in the DMD gene as a novel mechanism for Becker muscular dystrophy. *Hum Mutat* 21(6):608-14.
- Usuki F. 2006. [Specific inhibition of nonsense-mediated mRNA decay has the potential to rescue the phenotype of muscular dystrophy]. *Rinsho Shinkeigaku* 46(11):939-41.
- Usuki F, Yamashita A, Higuchi I, Ohnishi T, Shiraishi T, Osame M, Ohno S. 2004. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay rescues the phenotype in Ullrich's disease. *Ann Neurol* 55(5):740-4.
- Usuki F, Yamashita A, Kashima I, Higuchi I, Osame M, Ohno S. 2006. Specific inhibition of nonsense-mediated mRNA decay components, SMG-1 or Upf1, rescues the phenotype of Ullrich disease fibroblasts. *Mol Ther* 14(3):351-60.
- van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, den Dunnen JT, Koop K, van der Kooi AJ, Goemans NM and others. 2007. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 357(26):2677-86.
- Varon R, Gooding R, Steglich C, Marns L, Tang H, Angelicheva D, Yong KK, Ambrugger P, Reinhold A, Morar B and others. 2003. Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nat Genet* 35(2):185-9.
- Vetrini F, Tammaro R, Bondanza S, Surace EM, Auricchio A, De Luca M, Ballabio A, Marigo V. 2006. Aberrant splicing in the ocular albinism type 1 gene (OA1/GPR143) is corrected in vitro by morpholino antisense oligonucleotides. *Hum Mutat* 27(5):420-6.
- Wang J, Smith PJ, Krainer AR, Zhang MQ. 2005. Distribution of SR protein exonic splicing enhancer motifs in human protein-coding genes. *Nucleic Acids Res* 33(16):5053-62.
- Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S and others. 2007. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447(7140):87-91.
- Whitehead VM. 2006. Acquired and inherited disorders of cobalamin and folate in children. *Br J Haematol* 134(2):125-36.
- Wilkinson MF. 2005. A new function for nonsense-mediated mRNA-decay factors. *Trends Genet* 21(3):143-8.
- Wilson A, Leclerc D, Rosenblatt DS, Gravel RA. 1999. Molecular basis for methionine synthase reductase deficiency in patients belonging to the cblE complementation group of disorders in folate/cobalamin metabolism. *Hum Mol Genet* 8(11):2009-16.

- Willard HF, Rosenberg LE. 1977. Inherited deficiencies of human methylmalonyl CoA mutase activity: reduced affinity of mutant apoenzyme for adenosylcobalamin. *Biochem Biophys Res Commun* 78(3):927-34.
- Willard HF, Rosenberg LE. 1980. Inherited methylmalonyl CoA mutase apoenzyme deficiency in human fibroblasts: evidence for allelic heterogeneity, genetic compounds, and codominant expression. *J Clin Invest* 65(3):690-8.
- Wood M, Yin H, McClorey G. 2007. Modulating the expression of disease genes with RNA-based therapy. *PLoS Genet* 3(6):e109.
- Worgan LC, Niles K, Tirone JC, Hofmann A, Verner A, Sammak A, Kucic T, Lepage P, Rosenblatt DS. 2006. Spectrum of mutations in mut methylmalonic acidemia and identification of a common Hispanic mutation and haplotype. *Hum Mutat* 27(1):31-43.
- Wu B, Li Y, Morcos PA, Doran TJ, Lu P, Lu QL. 2009. Octa-guanidine morpholino restores dystrophin expression in cardiac and skeletal muscles and ameliorates pathology in dystrophic mdx mice. *Mol Ther* 17(5):864-71.
- Yang X, Sakamoto O, Matsubara Y, Kure S, Suzuki Y, Aoki Y, Sakura N, Takayanagi M, Iinuma K, Ohura T. 2004. Mutation analysis of the MMAA and MMAB genes in Japanese patients with vitamin B(12)-responsive methylmalonic acidemia: identification of a prevalent MMAA mutation. *Mol Genet Metab* 82(4):329-33.
- Yoo H, Juliano RL. 2000. Enhanced delivery of antisense oligonucleotides with fluorophore-conjugated PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res* 28(21):4225-31.
- Yulug IG, Yulug A, Fisher EM. 1995. The frequency and position of Alu repeats in cDNAs, as determined by database searching. *Genomics* 27(3):544-8.
- Zavad'akova P, Fowler B, Zeman J, Suormala T, Pristoupilova K, Kozich V. 2002. CblE type of homocystinuria due to methionine synthase reductase deficiency: clinical and molecular studies and prenatal diagnosis in two families. *J Inherit Metab Dis* 25(6):461-76.
- Zhang J, Dobson CM, Wu X, Lerner-Ellis J, Rosenblatt DS, Gravel RA. 2006. Impact of cblB mutations on the function of ATP:cob(I)alamin adenosyltransferase in disorders of vitamin B12 metabolism. *Mol Genet Metab* 87(4):315-22.

8. PUBLICACIONES

Parte de este trabajo se encuentra descrito en las siguientes publicaciones:

- Qualitative and quantitative analysis of the effect of splicing mutations in propionic acidemia underlying non-severe phenotypes. S. Clavero, B. Pérez, **A. Rincón**, M. Ugarte y L. R. Desviat. Hum Gen (2004) 115:239-247
- Mutational spectrum of isolated methylmalonic acidemia: twenty-two novel allelic variants. M. A. Martínez*, **A. Rincón***, L. R. Desviat, B. Merinero, M. Ugarte y B. Pérez. *: ambos autores contribuyen igual al trabajo. Mol Genet Metab (2005) 84 (4):317-325
- Propionic and Methylmalonic Acidemia: antisense therapeutics for intronic variations causing aberrantly spliced mRNA. **A. Rincón***, C. Aguado*, L. R. Desviat, R. Sanchez-alcudia, M. Ugarte y B. Pérez. *: ambos autores contribuyen igual al trabajo. Amer. J. Hum. Genet. 2007
- Methylmalonic Acidemia: examination of genotype and biochemical data in 32 patients belonging to mut, cblA or cblB complementation group. B. Merinero, B. Pérez, C. Pérez-Cerdá, **A. Rincón**, L. Ruiz-Desviat, M.A. Martínez, P. Ruiz Sala, M^aJosé García, L. Aldamiz-Echevarría, J. Campos, V. Cornejo, M. del Toro, A. Mahfoud, M. Martínez-Pardo, R. Parini, C. Pedrón, L. Peña-Quintana, M. Pérez, M. Pourfarzam, M. Ugarte. J Inherit Metab Dis 31 (2008) 55-66
- Pseudoexon-Exclusion by Antisense Therapy in Methylmalonic Aciduria. B. Pérez*, **A. Rincón***, A. Jorge-Finnigan, E. Richard, B. Merinero, M. Ugarte y L.R. Desviat. *: ambos autores contribuyeron igual al trabajo. Hum. Mutat (en prensa)
- Functional and Structural Analysis of Five Mutations Identified in Methylmalonic Aciduria *cblB* Type. A. Jorge-Finnigan, C. Aguado, R. Sanchez-Alcudia, **A. Rincón**, E. Richard, B. Merinero, R. Banerjee, L.R. Desviat, M. Ugarte y B. Pérez. (en preparación)